

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
KRIEM SOUKAÏNA

PURIFICATION ET CARACTÉRISATION
DE TOXINES DU CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE
TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM

MAI 1992

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Tolypocladium cylindrosporum est un Deutéromycète qui peut avoir un rôle considérable dans la lutte biologique.

En effet, on peut le considérer comme une alternative du B.t.i. (Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis) par le biais des toxines qu'il produit dans le milieu de culture.

T. cylindrosporum produit deux catégories de toxines selon qu'il est cultivé en milieu liquide agité ou stable.

Dans le premier cas (milieu liquide agité) ce champignon produit des toxines de haut poids moléculaire, et dans le deuxième cas, il produit des toxines de faible poids moléculaire.

Avec le filtrat obtenu de la culture du champignon en milieu liquide agité, et suite aux différents gels de chromatographie utilisés (Sephacryl^R S-200, Sephadex^R G-50 et FPLC), la technique d'électrophorèse en SDS-PAGE a permis la détection, à la fin du processus de purification, de trois bandes correspondant à des poids moléculaires élevés.

L'une de ces trois bandes, correspondant à un poids moléculaire de 63 000 DA et de nature probablement protéique, est la bande majeure de la dernière fraction de chromatographie. De plus, cette fraction s'est révélée toxique pour les larves de moustiques.

Le test de stabilité à la chaleur montre que les toxines de ce champignon, cultivé avec agitation, persistent à une température assez élevée (100°C), de manière comparable aux toxines de B.t.k (Bacillus thuringiensis sérovariété kurstaki).

Aussi, on a confirmé la présence, en culture stable, de toxines de faible poids moléculaire comme démontrée par Weiser et Matha, 1988.

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de recherche.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de recherche, le Docteur Guy Charpentier pour le rôle prépondérant qu'il a joué dans ma formation scientifique. La réalisation de ce projet a été permise grâce à ses connaissances ainsi qu'à ses conseils.

Je remercie le Docteur Julien Gruda pour ses judicieux conseils.

Je remercie également le Docteur Hélène-Marie Thérien pour son aide apportée lors des difficultés rencontrées.

Je tiens aussi à remercier Madame Liette Laganière, technicienne au laboratoire pour m'avoir familiarisée au travail dans un laboratoire de microbiologie, aidée et conseillée.

Je n'oublierai pas de remercier Madame Christiane Sarrazin pour son aide et son amitié appréciées.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DE MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	21
II-1 Souche du champignon.....	21
II-1.1 Production de conidies.....	21
II-1.2 Production du filtrat de champignon.....	22
II-1.2.1 Mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation.....	22
II-1.2.2 Mise en culture du champignon en milieu liquide sans agitation.....	24
II-2 Essais biologiques sur moustiques.....	25

II-2.1	Espèce cible.....	25
II-2.2	Développement larvaire d' <u>A. triseriatus</u>	26
II-2.3	Essais biologiques.....	27
II-2.3.1	Bioessai avec le filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation.....	32
II-2.3.2	Bioessai avec le filtrat de champignon obtenu à partir de la mise en culture en milieu liquide stable.....	33
II-2.4	Méthodes de purification.....	33
II-3	Protocole de purification des toxines du filtrat de champignon mis en culture avec agitation.....	34
II-3.1	Sac à dialyse.....	34
II-3.2	Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	36
II-3.3	Chromatographie.....	39
II-3.3.1	Séphacryl ^R S-200 superfine.....	39

II-3.3.2	Chromatographie d'exclusion: Gel de filtration sur Sephadex ^R	43
II-3.3.3	Flow Pressure liquide chromatography (FPLC).....	46
II-3.4	Estimation du P.M des molécules toxiques du filtrat de champignon.....	48
II-3.5	Technique d'électrophorèse.....	50
II-3.6	Test de la chaleur.....	55
II-4	Extraction des toxines du filtrat de champignon mis en culture sans agitation.....	56
II-4.1	Extraction par le chloroforme.....	56
II-4.2	Précipitation par le méthanol.....	57
III.	Résultats.....	59
IV.	Discussion.....	82
	Bibliographie.....	99
Annexes		
A.	Gélose "pabulum".....	105
B.	Milieu Sabouraud dextrose Broth.....	105
C.	Tampon phosphate.....	106
D.	Tampon phosphate (plus NaCl).....	106

- E. AmSO_4 à ajouter (mg) à 1 ml du filtrat pour avoir le % de saturation
à 0°C..... 107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU

1. Effet de filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation sur les larves de moustiques (L_3)..... 66
2. Effet de filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide sans agitation, sur les larves de moustiques (L_3)..... 67
3. Résultats du test d'adialysat et du dialysat du filtrat (mis en culture avec agitation) sur les larves de moustiques (L_3) (Membrane: PM \leq 14 kDa)..... 68
4. Résultats du test pilote du filtrat avec le sulfate d'ammonium, sur les larves de moustiques (L_3)..... 69
5. Résultats du test sur les larves de moustiques (L_3) avec les fractions récoltées à partir du Séphacryl^R S-200..... 70
6. Résultats du test sur les larves de moustiques (L_3) avec les fractions récoltées à partir du Séphadex^R G-50..... 71
7. Résultats du test sur les larves de moustiques (néonates) avec les fractions récoltées à partir de la FPLC..... 72
8. Résultats du test d'adialysat et de dialysat sur les larves de moustiques (L_3) (Membrane PM (25 kDa)..... 73

9.	Résultats du test d'adialysat et de dialysat sur les larves de moustiques (L_3) (Membrane: PM \leq 50 kDa).....	74
10.	Électrophorèse en SDS-PAGE des standards de poids moléculaires.....	75
11.	Électrophorèse en SDS-PAGE du filtrat de champignon.....	76
12.	Électrophorèse en SDS-PAGE des fractions récoltés à partir des gels de chromatographie: S-200, G-50 et FPLC.....	77
13.	Test de la chaleur.....	79
14.	Effet de la tolypine sur les larves de moustiques (L_3).....	80
15.	Effet des cyclosporines sur les larves de moustiques (L_3).....	81

LISTE DES FIGURES

FIGURE

1.	Phialides de <u>T. cylindrosporum</u> formées sur les conidiphores.....	13
2.	Conidies de <u>T. cylindrosporum</u>	13
3.	Blastoconidies de <u>T. cylindrosporum</u>	15
4.	Schéma complet de <u>T. cylindrosporum</u>	15
5.	Pénétration du champignon à travers la cuticule de larve de moustique.....	17
6.	Colonie de champignon sur une larve de moustique.....	17
7.	Structure de la cyclosporine A.....	20
8.	Structure de la Tolypine.....	20
9.	Mise en culture de <u>T. cylindrosporum</u> sur agitateur.....	23
10.	Larve de 1er stade d' <u>Aedes triseriatus</u> , démontrant le bouton céphalique, en position dorsale.....	28
11.	Larve de 2e stade d' <u>Aedes triseriatus</u> , en vue latérale, montrant une plaque sclérotisée au niveau du métathorax.....	28
12.	Larve du 3e stade d' <u>Aedes triseriatus</u> , en vue latérale, montrant deux plaques sclérotisées au niveau du métathorax.....	29

13.	Larve de 4e stade, d' <u>Aedes triseriatus</u> , en vue latérale, montrant les deux plaques sclérotisées et la soie 1-X complètement entourée par la sclérotisation de la selle.....	29
14.	Chromatographie du filtrat sur Sephacryl ^R S-200.....	60
15.	Chromatographie du filtrat de <u>I. cylindrosporum</u> sur Sephadex ^R G-25 (2e pic du S-200).....	61
16.	Chromatographie du filtrat de <u>I. cylindrosporum</u> sur Sephadex ^R G-50 (2e pic du S-200).....	62
17.	Chromatographie du filtrat de <u>I. cylindrosporum</u> sur Sephadex ^R G-75 (2e pic du S-200).....	63
18.	Chromatographie du filtrat (1er pic du G-50) sur la FPLC.....	64
19.	Chromatographie du filtrat (2e pic du G-50) sur la FPLC.....	65
20.	Tracé de la courbe P.M. en fonction de R.F.....	75
21.	Électrophorèse en SDS-PAGE.....	78

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les insectes étaient en possession de la terre depuis des millions d'années lorsque l'homme est apparu. Ils avaient traversé des époques d'une durée prodigieuse sans perdre de leur vitalité et sans que jamais leur nombre ait diminué. Avec ce tard venu, qui prétendait bientôt dominer toute la terre, il n'est pas surprenant qu'une lutte se soit vite engagée (Berland, 1948).

À côté des insectes qui nous attaquent personnellement et mettent notre vie en péril, il y a ceux qui s'acharnent à détruire nos biens, et en particulier les plantes cultivées. D'autres dévastent nos forêts, ce qui est aussi une perte pécuniaire importante (Berland, 1948).

Depuis longtemps, l'homme est conscient que les insectes sont la cause de maladies (Burges et Hussey, 1971).

En effet, les moustiques et les simulies s'attaquent à l'homme et aux autres vertébrés. Chez la plupart des espèces, les adultes femelles vont piquer le vertébré et prélever une quantité de sang qui est utilisée en partie pour la nutrition, mais

surtout pour la maturation des oeufs. Certaines femelles peuvent effectuer plusieurs repas sanguins sur des hôtes différents. Lors d'un repas sanguin, ces insectes hématophages peuvent transmettre un grand nombre d'organismes: bactéries, protozoaires, virus et helminthes, dont certaines peuvent être pathogènes pour l'hôte (Lacey et Undeen, 1986). On parle alors de vecteurs, c'est-à-dire d'organismes qui assurent la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux, d'un vertébré à un autre vertébré (Rodhain et Perez, 1985).

Ainsi, le plus grand dommage que les insectes nous causent, c'est de nous transmettre quelques maladies très graves (Berland, 1948). Parmi ces maladies, on distingue:

- Le paludisme: connu de tous temps, le paludisme se trouve presque sur toute la terre, non seulement dans la région tropicale, mais dans les régions plus tempérées. Seuls, les pays froids en sont indemnes. Les moustiques qui communiquent le paludisme, c'est-à-dire inoculent l'hématozoaire qui en est l'agent, appartiennent au genre Anopheles.
- La fièvre jaune: cette maladie se rencontre dans la partie tropicale de l'Amérique du sud, l'Amérique centrale, les Antilles, le sud des États-Unis et une large bande de l'Afrique occidentale. L'agent responsable est un virus désigné sous le nom de virus amaril et il est transporté par un moustique, le

Stegomyia fasciata.

- La maladie du sommeil: L'agent est un protozoaire flagellé Trypanosoma gambiense qui est transmis par les tsé-tsé et principalement par Glossina palpalis (Berland, 1948).

En plus de ces maladies, on distingue la dengue, l'onchocercose, les filarioses, de nombreux arbovirus, etc. (Samson, 1984).

Au Canada, les plus importants pathogènes transmis par les diptères piqueurs sont les arbovirus qui se retrouvent, entre autres, chez l'homme, lorsque les populations d'insectes piqueurs deviennent anormalement élevées. Certains de ces virus causent des encéphalites (Wood, 1985).

En effet, en été 1978 et dans deux régions du Québec, trois cas d'infection par le virus du groupe Californie ont été sérologiquement diagnostiqués chez l'homme. De plus, les résultats des tests sérologiques ont suggéré que le virus Snowshoe hare (SSH) était la cause de ces trois cas d'infections. Ces résultats rapportent aussi que trois espèces de moustiques (A. communis, A. punctor et A. excrucians) ont été impliquées dans la transmission du virus SSH dans ces régions.

Notons que des animaux tels que les lièvres, les lapins et les chevaux ont été

aussi exposés au virus SSH, puisqu'on retrouve des titres élevés d'anticorps contre ces virus dans le sérum de ces animaux (Belloncik et al., 1982).

Les insectes piqueurs affectent aussi les animaux au point de provoquer une:

- diminution du gain de poids et de la croissance chez les animaux immatures;
- baisse de la production de lait chez les vaches;
- mortalité chez les animaux d'élevage (bétail, oiseaux);
- baisse du rendement des animaux reproducteurs;
- mortalité des nouveaux reproducteurs importés car non adaptés aux insectes piqueurs du Canada (Laird et al., 1983).

L'insecte piqueur, en plus d'être un vecteur de maladies humaines ou animales graves, représente une source de nuisance.

En effet, cette nuisance peut provoquer chez les humains une diminution du temps alloué aux activités de plein-air (pêche, chasse, camping, etc.) et donc une baisse de fréquentation des parcs, centres, bases et autres lieux de villégiature

(Nadeau, 1990).

De plus, le problème peut être sérieux pour les gens qui doivent travailler à l'extérieur, comme les fermiers et les forestiers (NRCC, 1982). Et il est important de noter que la piqûre de certaines espèces de mouches noires provoque chez les individus susceptibles, des lésions dermales associées à des signes cliniques (Casselle et Hay, 1991); et il en est de même pour d'autres insectes piqueurs (NRCC, 1982).

Donc, pour des raisons économiques et de santé, il devient de plus en plus nécessaire de chercher des moyens de lutter contre ces insectes piqueurs afin de réduire les populations de ceux-ci.

Les insecticides chimiques ont joué, et jouent encore un rôle très important dans la lutte contre les insectes nuisibles; nous nous attarderons au cas des insectes piqueurs.

En effet, dès le début de 1939, le chimiste Paul Muller découvre le pouvoir insecticide du dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT). C'est le premier insecticide vraiment efficace dans la lutte antivectorielle.

De 1940 à 1950, on assiste au développement des insecticides

organophosphorés et des carbamates (Flint et Van den Bosh, 1981).

Puis, ce fut l'utilisation de méthoxychlore ainsi que l'ABATE (Téméphos) pour lutter contre les mouches noires (Laird et al., 1983).

Malheureusement, depuis l'introduction des insecticides chimiques dans la lutte contre les insectes, il est apparu des résistances chez l'insecte, d'abord contre le DDT puis contre le téméphos et finalement contre les insecticides chimiques plus récents comme le chlorphoxime (NRCC, 1982).

De plus, il s'est avéré que ces insecticides créent des problèmes à l'environnement par leur non sélectivité et leur persistance (Back et al., 1983). Ils peuvent également s'accumuler le long de la chaîne alimentaire et avoir des effets à long terme, comme ce fût le cas pour le DDT (Rodhain et Perez, 1985).

Depuis, il est devenu de plus en plus nécessaire d'accorder une priorité aux insecticides microbiologique comme moyen de lutte contre les insectes.

La prédation par les vertébrés (oiseaux ou poissons) ou par des invertébrés (autres insectes aquatiques, crustacés, etc.) est considérée comme faible et ne serait donc pas un moyen efficace et rapide (Davies, 1981).

Les parasites et les pathogènes d'insectes piqueurs se divisent en plusieurs catégories qui comprennent les protozoaires, les nématodes, les virus, les bactéries et les champignons. A l'heure actuelle, les recherches les plus prometteuses en matière de lutte contre les diptères piqueurs portent sur la production et l'emploi de parasites et d'agents pathogènes. Dans ce domaine, ces organismes sont nettement supérieurs aux prédateurs étant donné, dans la majorité des cas, qu'ils s'attaquent exclusivement aux diptères piqueurs (spécificité) et qu'ils n'ont pas à se trouver une autre source d'alimentation lorsque les diptères disparaissent, car leur cycle de vie est adapté à celui de ces derniers (Wood, 1985).

Jusqu'à maintenant, les virus semblent avoir peu de potentiel comme agents de contrôle, pour les insectes aquatiques (Charpentier, 1992).

Parmi les protozoaires, les microsporidies sont les plus étudiés comme agents de contrôle. Leurs cycles de vie sont très complexes et pas totalement connus, donc on ne peut pas évaluer leur potentiel pour le contrôle microbiologique (Charpentier, 1992).

Avec les Nématodes, on obtient de bons résultats mais leur coût de production rend ce type de traitement insecticide prohibitif (Molloy et Jamnback, 1977).

Toutefois, certaines bactéries ont déjà démontré leur capacité pour le contrôle

biologique des diptères piqueurs. Depuis sa découverte par Goldberg et Margalit (1977) en Israël, le B.t.i. (Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis) a été testé en laboratoire puis sur le terrain. On procéda par la suite à plusieurs traitements larvicides au moyen de cette bactérie qui firent rapidement du B.t.i., l'insecticide microbiologique le plus prometteur dans la lutte biologique. Cette bactérie est maintenant largement utilisée contre les larves de moustiques et de mouches noires; aussi il existe des préparations commerciales vendues par diverses compagnies. Il existe aussi, contre les moustiques, des préparations commerciales de B. sphaericus. De plus, il s'est avéré que le B.t.i. ne constitue pas un danger pour la faune non cible (Back et al., 1985).

Cependant, la crainte de voir se développer des résistances à cette dernière (B.t.i.) amène à chercher une alternative, soit l'utilisation des moisissures (Lepage et al., sous presse).

En effet, les champignons entomopathogènes méritent une attention bien particulière et pourraient être utilisés dans cette lutte biologique (Lacey et Undeen, 1986).

On connaît plus de 400 espèces de mycètes entomopathogènes (Hall et Papierok, 1982). Ceux affectant les diptères sont regroupés dans les classes suivantes: Chytridiomycètes, Oomycètes, Trichomycètes, Zygomycètes et

Deutéromycètes (De Barjac, 1987).

Chez certains de ces champignons entomopathogènes, il y a production de mycotoxines. Les toxines sont souvent supposées être des armes chimiques, soit pour la défense des micro-organismes, soit pour l'attaque de l'hôte. On distingue deux types de toxines:

- les endotoxines: ce sont des toxines produites à l'intérieur de la cellule;
- les exotoxines: ce sont des toxines secrétées dans le milieu de culture par les cellules durant la phase active de leur croissance (Burges et Hussey, 1971).

Plusieurs mycotoxines ont été identifiées et/ou isolées de filtrats de cultures ou de mycélium de: Beauveria, Métarhizium, Nomuraea, Fusarium, Aspergillus, Verticillium, Paecilomyces, Isaria, Cordyceps et Entomophthora (Ignoffo, 1988).

Parmi les mycotoxines déjà purifiées, on distingue:

- les destruxines: l'hyphomycète Métarhizium anisopliae appartenant à la classe des Deuteromycètes produit plusieurs composés toxiques tels que: la prodestruxine, les destruxines A, B, C, D et la desmethyldestruxine B, et par la suite, on a isolé, à partir de ce champignon, les destruxines E₁, A₁, A₂, B₁,

B₂, C₂, D₁, D₂ et E₁. Ces dernières sont des cyclodepsipeptides. On a aussi isolé les protéases, les cytochalasines à partir du milieu de culture de ce même champignon (Païs et al., 1981). Métarhizium anisopliae s'attaque aux Orthoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Hyménoptères et Arachnides (Ignoffo, 1988). Il s'attaque aussi aux Diptères (Mohamed et Nelson, 1985).

- La cordycépine (3'-déoxyadénosine): c'est une toxine produite par le Pyrenomycète clavicipitale Cordyceps militaris appartenant à la classe des Ascomycotina. Plus de 250 espèces de cordyceps ont été trouvées sur des espèces de Diptères, Hyménoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Isoptères et Araignées (Ignoffo, 1988).
- Aflatoxines: Ce sont des toxines produites par Aspergillus flavus et A. parasiticus. On distingue les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. A. flavus est un organisme ubiquiste qui constitue un contaminant d'aliments et de produit des aflatoxines (Wright, 1982). D'autre part, ces substances constituent pour les vertébrés des cancérigènes hépatiques (Vey, 1970). Un mélange d'aflatoxines provoque une réduction de fertilité chez les moustiques (Aedes aegypti) (Wright et al., 1982). Chez les lépidoptères, les orthoptères et les coléoptères, les aflatoxines administrés à fortes doses provoquent une paralysie et des cas de mortalité rapide (Vey, 1970).

De plus, plusieurs enzymes de champignons peuvent être d'intérêt considérable dans la pathologie des insectes. En effet, on a pu purifier une enzyme lipolytique à partir de Métarhizium anisopliae, une enzyme protéolytique à partir de Cordyceps militaris et une quantité considérable d'amylases à partir d'Aspergillus flavus (Burges et Hussey, 1971). De plus, des protéases A et B ont été isolées à partir de Beauveria bassiana et de M. anisopliae (Vey, 1989).

Toutes ces enzymes semblent être toxiques pour les insectes et endommagent avec une grande vitesse et spécifiquement quelques fonctions physiologiques par l'hydrolyse de certaines protéines (Burges et Hussey, 1971).

En plus de ces enzymes, on note la présence de toxines protéiques telles que:

- Les toxines protéiques de Fusarium solani et Hirsutella thompsonii.
- Les toxines protéiques de corps hyphaux et protoplastes d'entomophthorales (Vey, 1989).

À côté de ces toxines protéiques, les champignons pathogènes secrètent aussi des toxines de faible poids moléculaire comme:

- Les pigments: composés naphthazariniques: Fusarubine, Javanicine, etc. (E. solani) (Burges et Hussey, 1971).
- Les Acides: + Acide oxalique, acide kojique et cyclopyazonique
+ Acides produits par E. virulenta (Vey, 1989).

L'objectif de ma recherche est de purifier puis caractériser les toxines d'un champignon entomopathogène, Tolypocladium cylindrosporum.

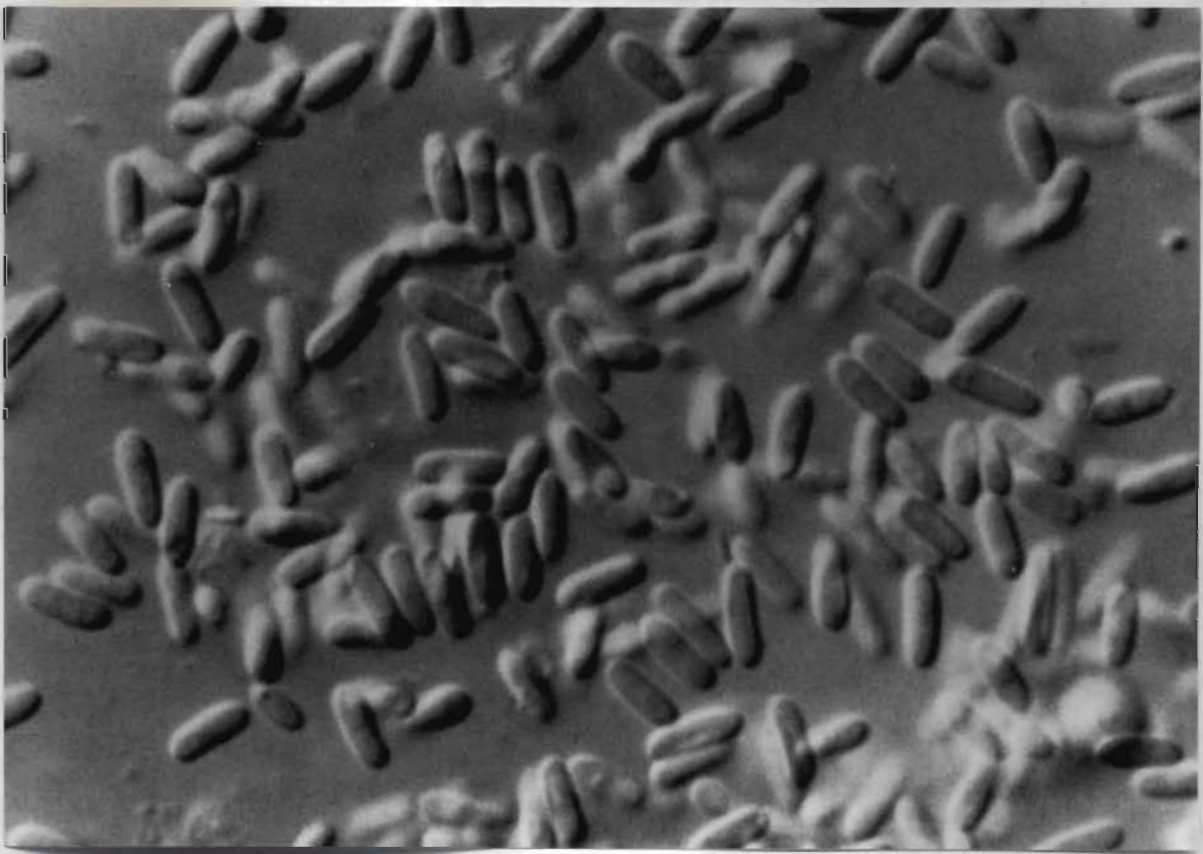
Tolypocladium cylindrosporum appartient à la classe des Deutéromycètes (Hyphomycète). Ce dernier a été décrit par Gams (1971) à partir d'échantillons du sol, mais n'a pas été reconnu à cette période comme un entomopathogène. En 1978, ce champignon a été découvert infectant les moustiques, Aedes sierrensis, en Californie et plus tard, il a été rapporté chez Aedes australis en Nouvelle-Zélande (Soares et al., 1985).

Tolypocladium possède deux unités infectieuses: les conidies et les blastoconidies ou blastospores ou encore corps hyphaux.

- conidie: c'est une spore asexuée, aérobie, produite en milieu gélosé; elle naît à partir d'une structure sporogène nommée phialide (voir figures 1 et 2);

Figure 1. Phialides de T. cylindrosporum formées sur les condiphores (Samson et al., 1988)

Figure 2. Conidies de Tolypocladium cylindrosporum (Samson et al., 1988)



- Blastoconidie: c'est également une spore asexuée, anaérobie et comparativement à la conidie, elle naît en milieu liquide à partir des cellules hyphales (voir figure 3).

Ce sont des structures plus ou moins cylindriques et de dimensions différentes:

Conidie: (1-1,5 μm x 2,5 - 3,5 μm)

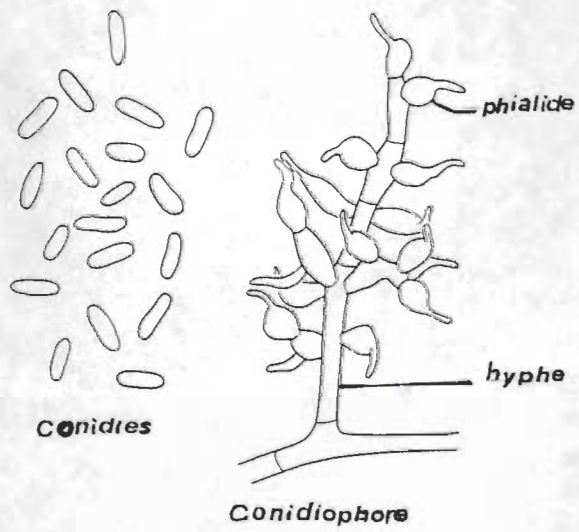
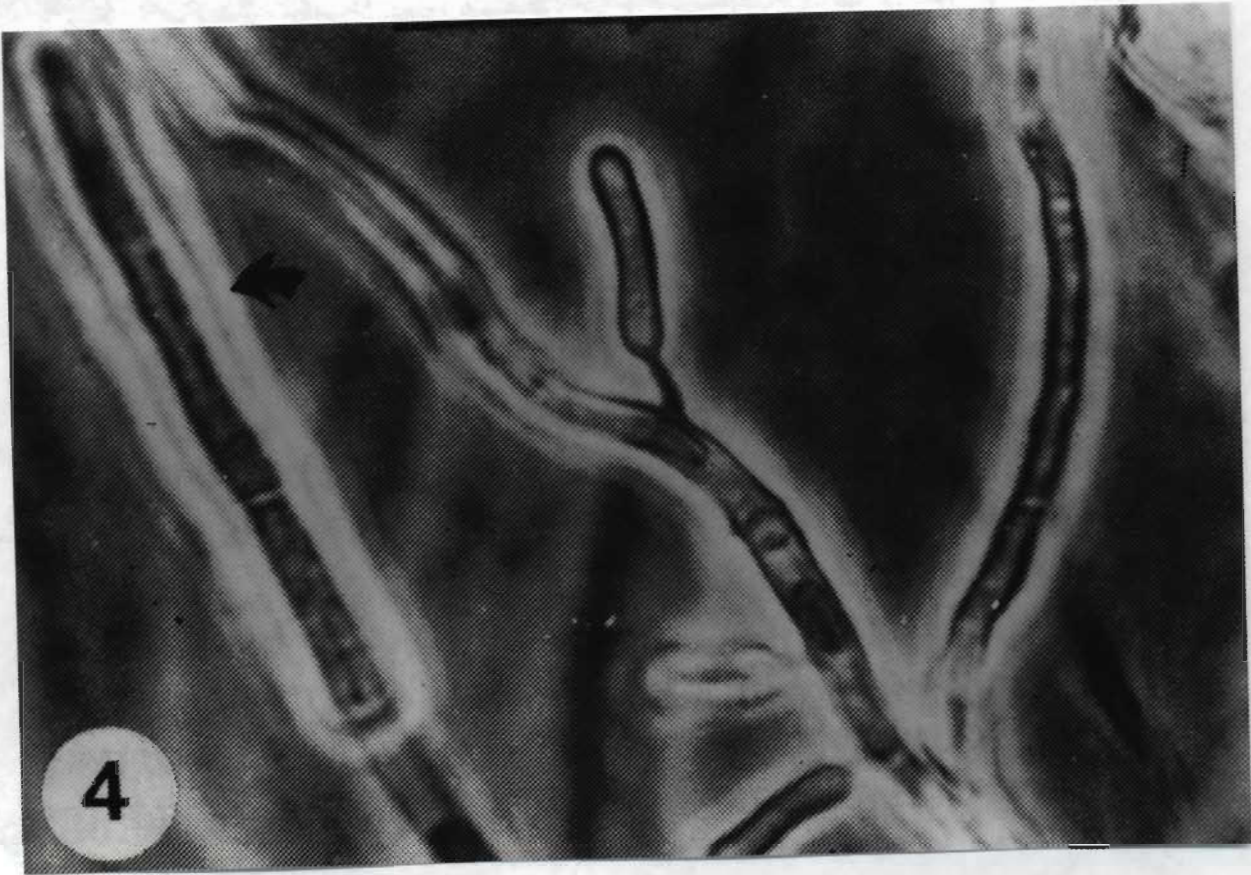
Blastoconidie: (2,5 - 5,0 μm x 4,0 - 22,2 μm) (Weiser et Pillai, 1981).

Tolypocladium cylindrosporum est caractérisé par des hyphes minces et cloisonnés et des conidiophores courts, cylindriques et cloisonnés, avec des verticilles de phialides latéraux ou apicaux gonflées à leur base (voir figure 4). Ces dernières donnent naissance aux conidies. La conidie est une cellule hyaline, cylindrique, droite ou légèrement courbée. Les colonies sont inodores, à surface cotonneuse, de couleur blanche à crème. Jusqu'à maintenant, aucune présence de chlamydospores (forme sexuée) n'a été observée (Weiser et Pillai, 1981).

Chez les larves de moustiques, l'infection d'habitude se produit à travers le canal d'alimentation, plus précisément l'intestin moyen, ou à travers la cuticule externe (voir figure 5). Et il semble que celle-ci s'oppose faiblement à cette pénétration (Samson, 1984). Notons qu'au niveau de l'infection, il n'y a pas de gonflement de la cuticule externe, ce qui montre qu'il n'y a pas d'interventions de forces mécaniques,

Figure 3. Blastoconidies de T. cylindrosporum (Soares, 1982)

Figure 4. Schéma complet de T. cylindrosporum (Bissett, 1983)



et donc la pénétration se fait par la sécrétion d'enzymes par le champignon au niveau de la cuticule de l'insecte (Soares, 1982).

Une fois à l'intérieur du corps des larves, les conidies germent et donnent des hyphes, qui, à leur tour, bourgeonnent pour donner des blastoconidies. Celle-ci se dispersent dans d'autres parties de l'hémocoèle où elles initient de nouveaux sites d'infections (Samson, 1984).

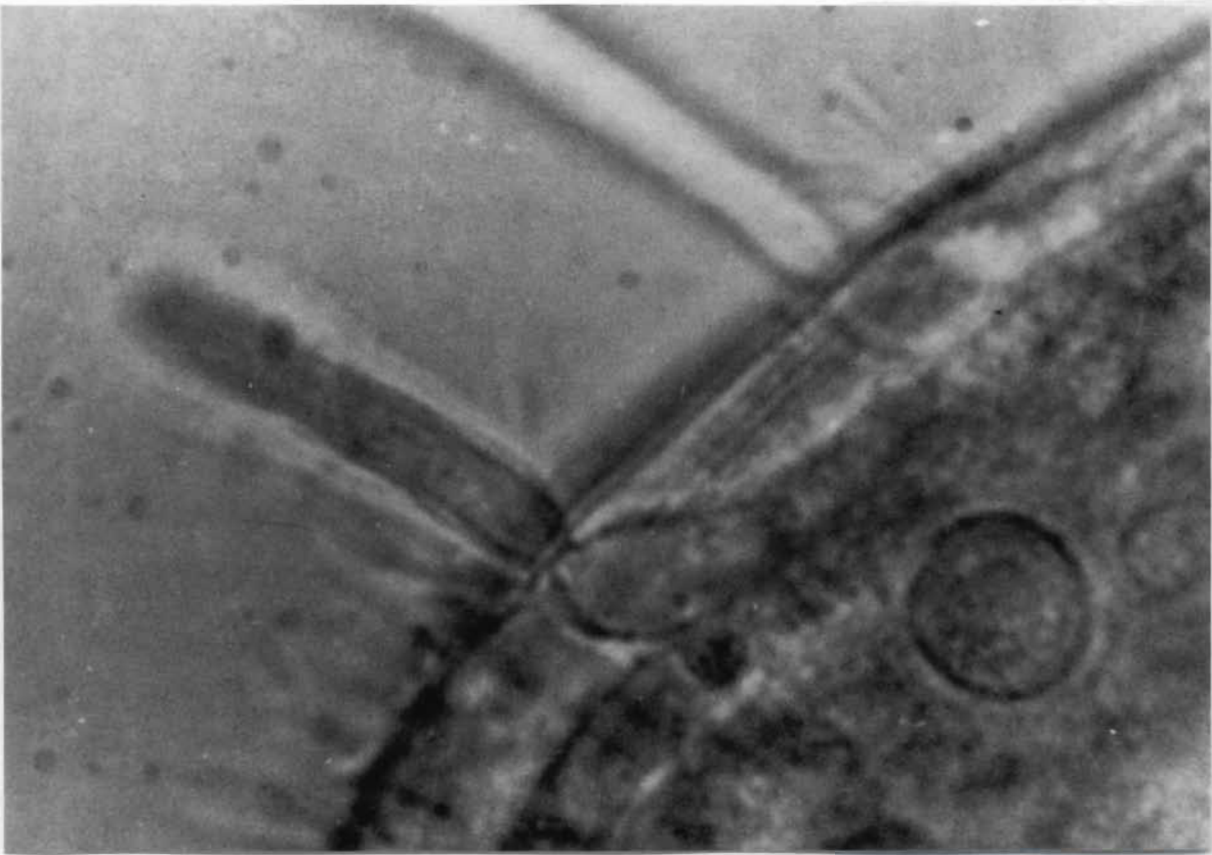
Les larves infectées montrent des symptômes macroscopiques d'une mycose au cours du deuxième jour après l'exposition, et meurent quand elles sont intensément envahies par le champignon (Samson, 1984).

Soulignons que l'invasion de l'hémocoèle et la croissance intense du champignon interviennent toujours avant la mort de la larve (Soares, 1982), de même que le champignon n'envahit pas les insectes morts, larves, pupes et adultes même après un contact prolongé (Weiser et Pillai, 1981).

Après la mort des larves par le champignon, les hyphes émergent des corps et continuent de pousser. Si les cadavres sont immergés, les hyphes vont pousser à l'extérieur dans toutes les directions, et à partir de toutes les parties du corps, et aussi des parties sclérosées comme la tête et le tube siphonal. La croissance des hyphes continue jusqu'à ce que les substances nutritives du cadavre soient épuisées.

Figure 5. Pénétration du champignon à travers la cuticule de larve de moustique
(Samson et al., 1988)

Figure 6. Colonie de champignon sur une larve de moustique (Samson et al.,
1988)



Ni les conidies, ni les blastoconidies ne sont produites de ces hyphes immergés (Soares, 1982). Si les cadavres sont près de la surface de l'eau, les hyphes vont former une touffe dense de mycélium, généralement au bout du tube siphonal des larves. Un tel mycelium aérien produit des conidiophores qui vont donner naissance seulement aux conidies (voir figure 6) (Samson, 1984).

Les blastoconidies et les conidies de Tolypocladium cylindrosporum sont toutes les deux infectieuses, mais à concentration égale, les blastoconidies sont beaucoup plus virulentes que les conidies (Soares, 1982). En effet, à 10^5 spores/ml, le TL_{50} (Temps létal) des blastoconidies est égal à 4,1 jours, tandis que celui des conidies est égal à 26,6 jours.

Toutefois, les blastoconidies sont moins persistantes que les conidies car ces dernières prennent plus de temps pour germer que les premières (Riba et al., 1986).

En effet, approximativement 80% de blastoconidies et 0% de conidies ont germé après huit heures d'incubation à 26°C (Soares et al., 1984). De plus, la rapidité avec laquelle les blastoconidies tuent les larves de moustiques suggère que des métabolites toxiques produits par le champignon sont impliqués. Ces métabolites n'interviennent qu'une fois que le champignon se trouve à l'intérieur de l'hémocoel de la larve (Soares, 1982).

Notons que chez certaines espèces du genre Tolypocladium, on a déjà décrit des toxines de faible poids moléculaire.

En effet, les cultures de T. cylindrosporum et T. inflatum libèrent des métabolites entomotoxiques appelés cyclosporines (Weiser et Matha, 1988).

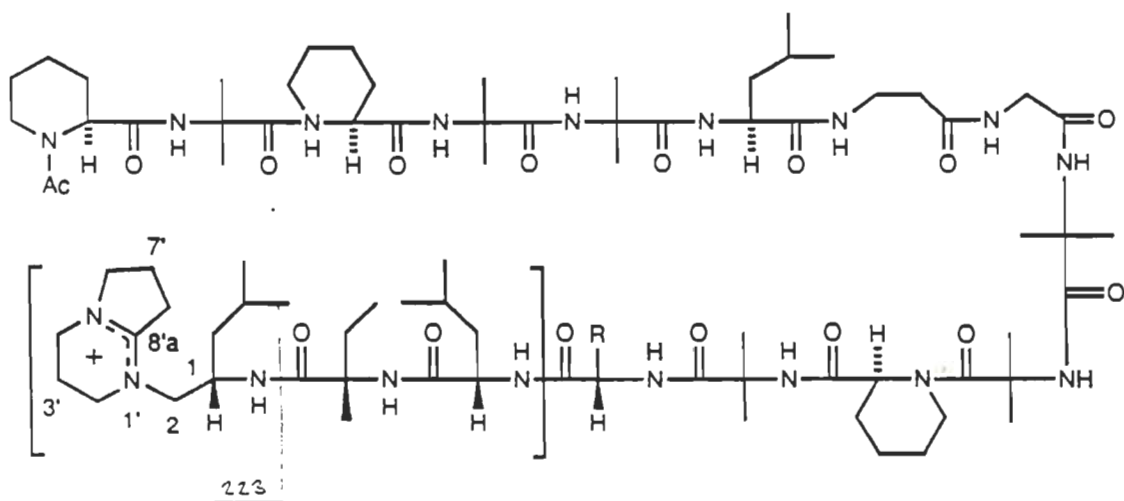
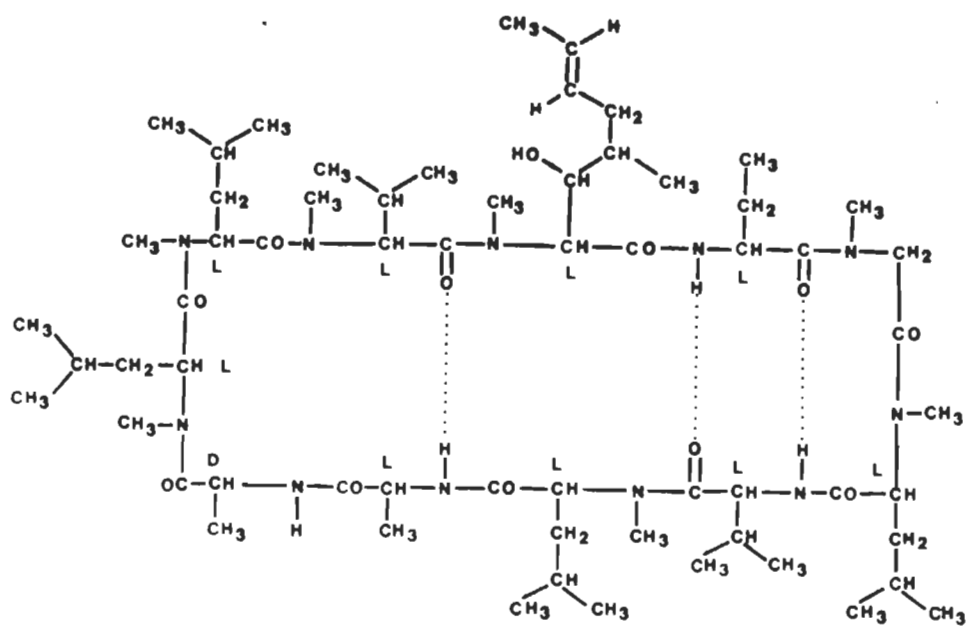
Il existe trois types de cyclosporines: A, B et C. La cyclosporine A est un peptide cyclique neutre contenant 11 acides aminés, 7 d'entre-eux sont N-méthylés, ce qui explique le caractère fortement non polaire du composé (voir figure 7), (Dreyfuss et al., 1987). En plus, ces cyclosporines sont solubles dans l'eau, et surtout ont des propriétés immunoppressives (Matha et Weiser, 1988).

Récemment, un nouvel insecticide, soluble dans l'eau et thermostable, est découvert chez les vieilles cultures de T. cylindrosporum et T. inflatum. Ce métabolite peut être extrait par l'eau ou les solvants organiques et on lui propose le nom de tolypine (voir figure 8) (Weiser et Matha, 1988).

Des tests faits sur des espèces de 3 genres de moustiques et 2 genres de mouches noires montrent que ces espèces sont susceptibles à la tolypine (Matha et al., 1988). De plus, des expériences ont montré que l'activité insecticide de la tolypine diffère de celle des cyclosporines (Matha et al., 1988).

Figure 7. Structure de la cyclosporine A (Dreyfus, 1976)

Figure 8. Structure de la Tolypine (Gupta, 1991)



- 1 R = H (Ac-L-Pip-Aib-L-Pip-Aib-Aib-L-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-L-Pip-Aib-Gly-L-Leu-L-Iva-X)
 2 R = CH₃ (Ac-L-Pip-Aib-L-Pip-Aib-Aib-L-Leu-β-Ala-Gly-Aib-Aib-L-Pip-Aib-L-Ala-L-Leu-L-Iva-X)

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-1 Souche du champignon

Tolypocladium cylindrosporum: La souche numéro 4561 de l'University of Alberta Microfungus Collection de ce champignon est utilisé pour nos expériences. Elle fût isolée d'Aedes sirrensis en Californie (États-Unis). On cultive T. cylindrosporum à 20°C sur l'agar contenant de la céréale d'avoine (gélose "Pablum") (Annexe A). On effectue des repiquages aux deux semaines pour maintenir la souche.

II-1.1 Production de conidies

Pour obtenir une bonne production de conidies, on repique le mycète dans des boîtes de Pétri, de 15 cm de diamètre, gélosées (gélose "Pablum"). Après deux ou trois semaines, le mycète couvre la surface des boîtes de pétri.

II-1.2 Production du filtrat de champignon

D'après Vey (communication personnelle), Tolypocladium cylindrosporum produit deux catégories de toxines, selon qu'il est cultivé en milieu liquide agité ou stable. Dans le premier cas (milieu liquide agité), ce champignon produit des toxines à poids moléculaire élevé. Et dans le deuxième cas (milieu liquide stable) il produit des toxines à faible poids moléculaire.

Ainsi, le but de nos expériences, c'est d'obtenir les deux catégories de toxines produites par T. Cylindrosporum.

II-1.2.1 Mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation

12 bouillons de 250 ml de Sabouraud dextrose Broth (Annexe B) dans des Erlenmeyers de 500 ml sont inoculés avec deux morceaux d'environ 1 cm², de gélose Pablum contenant du mycélium, découpés par un scalpel stérile. Les cultures sont incubées à la température de la pièce (20°C à 25°C) sur un agitateur à supports angulaires de marque Girotory - Model G2 (New Brunswick Scientific Co., Inc.) à approximativement 100 RPM (voir figure 9).

Figure 9. Mise en culture de T. cylindrosporum sur agitateur.



Au bout de 28 jours (maximum de production du champignon) (Lepage et al., sous presse), le mycélium est récupéré par filtration sur un filtre de 40 μm . Le filtrat est ensuite centrifugé à 1725 x g pendant 20 min. à 7°C, puis refiltré à 0.45 μm .

II-1.2.2 Mise en culture du champignon en milieu liquide sans agitation

On prépare 2 litres de milieu Sabouraud dextrose Broth, et on ajoute 50 g de glucose comme source d'énergie, puis on les répartit dans les Erlenmeyers de 250 ml. Soulignons que l'ajout de glucose favoriserait la production de toxines de faible poids moléculaire (Vey, communication personnelle). Après la croissance du champignon en milieu solide (sur gélose Pablum), on met deux morceaux de gélose de 1 cm^2 environ, contenant du mycélium et découpés par un scalpel stérile, dans chaque Erlenmeyer.

Les cultures sont ensuite incubées à la température de la pièce, en conditions stables, c'est-à-dire sans agitation.

Au bout de 28 jours, on procède de la même façon que la section II-I-2.1.

II-2 Essais biologiques sur moustiques

On peut définir un essai biologique comme étant une méthode qui permet d'évaluer la réponse d'un organisme vivant à un stimulus. Dans le cas des larvicides, on évalue la réponse (mort ou vivant) des larves à la présence d'une concentration ou d'une dose d'un mycète (stimulus) (Nadeau, 1990).

II-2.1 Espèce cible

Les essais biologiques sont réalisés avec des larves d'Aedes triseriatus. Le choix de cette espèce plutôt qu'une autre, c'est pour des raisons d'accessibilité, puisqu'il y a un élevage au laboratoire du groupe de recherche sur les insectes piqueurs à l'U.Q.T.R. Nous obtenons des individus sains de cet élevage exempt de maladies. Le contrôle de l'état sanitaire de l'élevage est effectué régulièrement par la technicienne en charge qui écarte les lots d'individus présentant des pathologies et désinfecte les contenants et les cages régulièrement.

Aedes triseriatus s'étend des États-Unis jusqu'au sud du Canada et colonise principalement les creux d'arbres, divers contenants et même les pneus dans les dépotoirs sont des habitats facultatifs pour les larves de cette espèce de moustique.

L'espèce fût reconnue comme vecteur du virus La Crosse, causant des encéphalites qui affligent principalement les enfants en bas âges.

Les larves d'A. triseriatus s'alimentent de deux façons: par filtration de la matière en suspension et/ou par broutage. Les oeufs de cette espèce multivoltine lui permettent de survivre pendant l'hiver ou les périodes de sécheresse (Savignac et Maire, 1981).

II-2.2 Développement larvaire d'A. triseriatus

Les oeufs de cette espèce proviennent de l'élevage du G.R.I.P. de l'U.Q.T.R.. Les larves sont élevées à 20°C avec une photopériode 16:8 et 50% d'humidité.

Aedes triseriatus possède des stades larvaires successifs séparés par des mues. Le premier stade se caractérise par la présence du bouton céphalique (fig. 10) au niveau de la face postérieure de la tête. Ce bouton céphalique a l'aspect d'un point noir et il sert à la larve à casser la coquille de l'oeuf.

Au deuxième stade, ce bouton céphalique n'existe plus. On observe de chaque côté du métathorax une plaque sclérotisée à la base des soies (fig. 11).

Au troisième stade, la larve est nettement plus grosse et on remarque deux plaques sclérotisées à la base des soies (fig. 12), situées de chaque côté du métathorax. Ces plaques permettent de bien distinguer les 2^e et 3^e stades larvaires. De plus, ce qui nous permet de dire que la larve est encore au 3^e stade c'est au niveau du 10^e segment où l'on voit un début de la sclérotisation de la selle près de la soie 1-X.

Finalement, au 4^e stade (fig. 13), les deux plaques sclérotisées de chaque côté du métathorax sont plus marquées et la soie 1-X est complètement entourée par la sclérotisation de la selle. En somme, ce qui permet de différencier le 3^e stade du 4^e stade, c'est la soie 1-X au niveau de la sclérotisation de la selle (Savignac et Maire, 1981). La durée des quatre stades larvaires est habituellement de 8 à 12 jours lorsque les conditions de température sont favorables pour l'espèce (Savignac et Maire, 1981).

À chaque mue se trouve abandonnée dans l'eau l'exuvie (tégument) du stade précédent.

II-2.3 Essais biologiques

Pour nos essais biologiques sur les larves de moustiques, nous avons mis des larves de 3^e stade, car c'est le stade le plus facile à manipuler. Pour

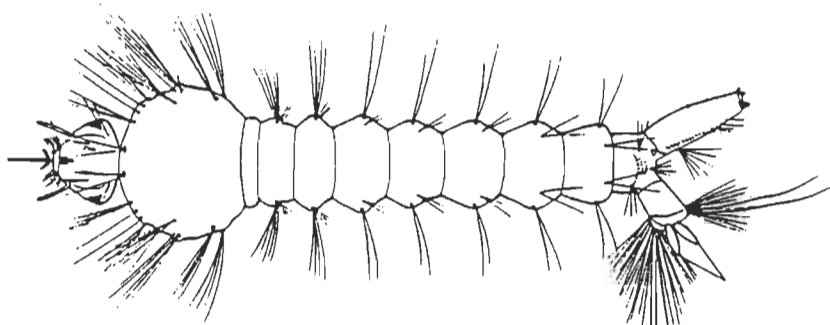


FIGURE 10: Larve de 1er stade d'*Aedes triseriatus*, démontrant le bouton céphalique, en position dorsale.
(Savignac et Maire, 1981)

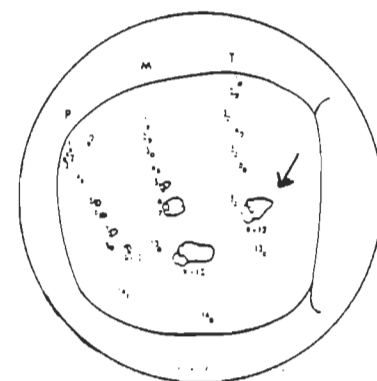
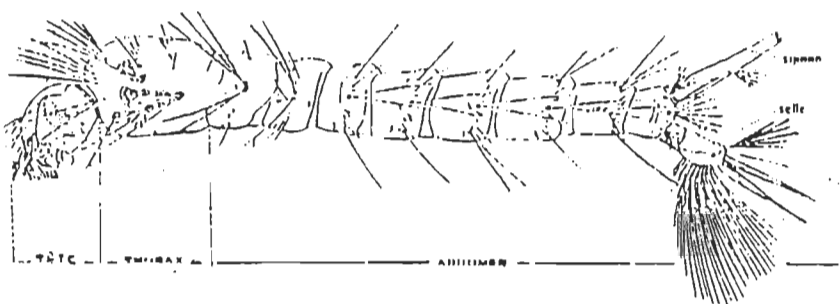


FIGURE 11: Larve de 2ième stade d'*Aedes triseriatus*, en vue latérale, montrant une plaque sclérotisée au niveau du métathorax.
(Savignac et Maire, 1981)

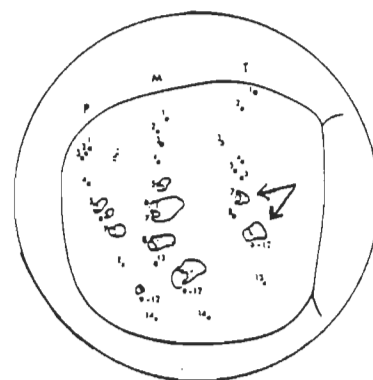
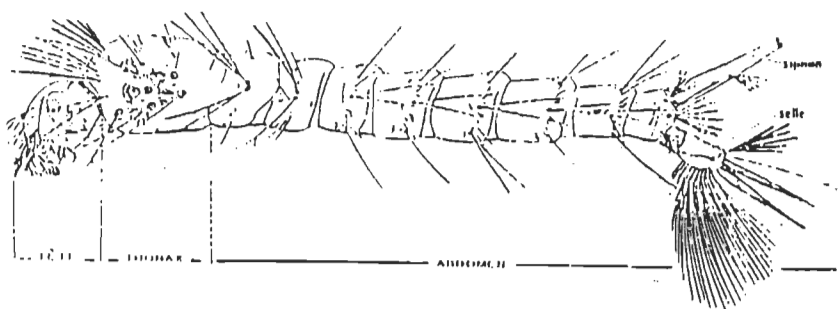


FIGURE 12: Larve de 3ième stade d'*Aedes triseriatus*, en vue latérale, montrant deux plaques sclérotisées au niveau du métathorax.
(Savignac et Maire, 1981)

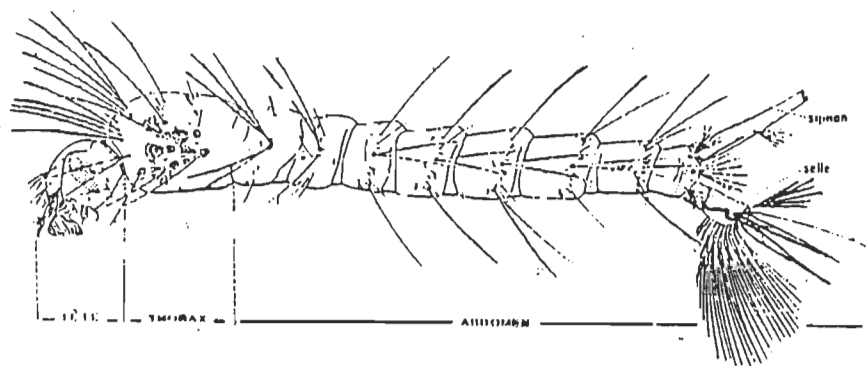


FIGURE 13: Larve de 4ième stade d'*Aedes triseriatus*, en vue latérale, montrant les deux plaques sclérotisées et la soie 1-X complètement entourée par la sclérotisation de la selle.
(Savignac et Maire, 1981).

obtenir le stade désiré, on procède de la façon suivante:

On place une certaine quantité d'oeufs dans un Pétri auquel on ajoute 25 ml d'eau distillée non déminéralisée. À la surface, on saupoudre de la levure, on laisse cela pendant six heures. Le contenu est transféré dans une litière avec 2 litres d'eau. À ce bassin, 5 ml de solution de foie de boeuf desséché (18 g/300 ml d'eau) est ajouté aux 3 jours. Après 6-7 jours, les larves sont rendues au 3e stade (L_3) (Savignac et Maire, 1981).

Au cours de nos expériences de purification des toxines, on a fait appel aux larves du 3e stade, mais aux dernières étapes de cette purification, on a utilisé les néonates suite aux dilutions du filtrat et aux pertes du produit à chacune des étapes de purification. De plus, avec les néonates, on obtient de bons résultats vu leur grande sensibilité aux insecticides (Ibarra et Federici, 1987).

Pour obtenir les néonates, on procède, pour l'éclosion des oeufs, de la même façon que précédemment (3e stade) sauf que les bioessais se font juste après l'éclosion.

Après avoir obtenu nos larves néonates, on procède comme suit:

- Dans un premier temps, on récupère les larves une à une à l'aide d'une

micro-pipette automatique et ajustable de 200 à 1000 microlitres (Finnpipette).

- Les larves sont ensuite déposées individuellement dans chacun des puits d'une plaque à 96 puits de culture de tissus (Falcon). Avec chaque larve, on prélève 100 microlitres du liquide dans lequel elles baignent.
- On ajoute un volume d'une dilution du filtrat du champignon à chacune des cupules.
- On place les plaquettes à une température de 28°C pendant 24 heures, après quoi, on compte à l'aide d'un binoculaire le nombre de larves mortes.

Pour déterminer si une larve est morte ou vivante, il suffit de déplacer légèrement la plaquette ou d'effleurer le liquide à l'aide d'une tige de verre à bout arrondi, ce qui a pour effet de faire bouger activement les larves vivantes.

Afin de connaître l'efficacité du filtrat du champignon sur les larves de moustiques, on procède comme suit:

II-2.3.1 Bioessai avec le filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation

Des lots de larves au 3e stade larvaire (L_3) sont mis dans des pots à prélèvement de 100 ml en plastique avec de l'eau distillée non déminéralisée (EDND) et la dilution de filtrat appropriée.

Lors de tests préliminaires faits sur le filtrat de champignon, on s'est rendu compte que ce dernier semble être très efficace sur les larves de moustiques, et ceci même à une dilution de 1/100 (Lepage et al., sous presse).

Alors, des dilutions de 1/10, 1/20, 1/50 et 1/100 du filtrat sont faites en triplicata. Des témoins avec l'EDND sans dilution et des témoins avec le milieu Sabouraud dextrose Broth pour des dilutions de 1/10 sont aussi faites en triplicata.

L'essai se déroule dans une chambre environnementale à 20°C, à une photopériode 16:8. Les larves sont nourries avec la solution du foie de boeuf et renourries au besoin (chaque jour: 0.2 ml de foie). De plus, de l'eau distillée non déminéralisée est additionnée périodiquement pour compenser l'évaporation. Les mortalités sont relevées à toutes les

24 heures pendant 6 jours.

II-2.3.2 Bioessai avec le filtrat de champignon obtenu à partir de la mise en culture en milieu liquide stable.

De la même façon, 2 lots de 30 larves du 3^e stade (L₃) sont mis dans des pots à prélèvement de 100 ml en plastique avec l'eau distillée non déminéralisée et la dilution de filtrat appropriée.

Vu qu'avec ce filtrat on n'a pas fait de tests préliminaires, alors une dilution de 1/5 du filtrat est faite en duplicata afin de tester son efficacité sur les larves de moustiques. Des témoins avec l'eau distillée non déminéralisée ainsi que le milieu Sabouraud sont aussi préparés.

L'essai se déroule dans les mêmes conditions que précédemment (III.3.1).

II-2.4 Méthodes de purification

Étant donné la nature et le poids différents des toxines du champignon obtenus dans les deux cas (avec ou sans agitation), on procède pour la purification des toxines, de deux manières différentes.

Dans le premier cas (culture du champignon en milieu liquide avec agitation), on fait appel à différentes méthodes de purification en gel vu que les toxines ont un poids moléculaire élevé. Notons que ces diverses méthodes sont effectuées à la suite l'une de l'autre avec les fractions obtenues avec la méthode précédente.

Dans le deuxième cas (culture en conditions stables), on fait appel à l'extraction par les solvants afin d'obtenir les toxines de faible poids moléculaire (Vey, communication personnelle).

II-3 Protocole de purification des toxines du filtrat de champignon mis en culture avec agitation

II-3.1 Sac à dialyse

On fait appel au sac à dialyse, comme première étape de purification afin d'évaluer la nature et le poids moléculaire des molécules toxiques du filtrat.

Les membranes de dialyse utilisées (de marque Pharmacia) sont conçues pour que seulement les molécules de poids moléculaire inférieur à 14 kDa puissent les traverser.

Le sac à dialyse est rempli avec 40 ml de filtrat de champignon puis immergé dans un bécher contenant 60 ml de tampon phosphate (voir annexe C). L'opération se fait à 4°C afin de limiter autant que possible les éventuelles contaminations bactériennes et les activités enzymatiques notamment celles des protéases possiblement présentes dans le filtrat de culture. Puis on dialyse 24 heures sous agitation.

Le deuxième jour, on récupère le dialysat afin de le tester par la suite sur les larves de moustiques (L_3).

Puis on met l'adialysat dans 500 ml de tampon phosphate dans le but de faire sortir du sac les petites molécules restantes. Le 3e jour, on refait la même opération. Ainsi, le 4e jour, on récupère l'adialysat qu'on teste, par la suite, sur les larves de moustiques (L_3).

Pour le test sur les larves de moustiques (L_3), on procède de la même manière qu'avec le filtrat du champignon, sauf que les dilutions préparées sont faites une seule fois, à cause du faible volume du liquide à tester.

Les résultats du test nous ont montré que la toxicité du filtrat se localise dans l'adialysat. Suite à cette constatation, on a procédé à la dialyse d'un grand volume du filtrat de champignon afin de se débarrasser des petites

molécules (non toxiques).

Notons qu'avec ce filtrat dialysé, on va procéder aux méthodes suivantes de purification.

II-3.2 Précipitation par le sulfate d'ammonium

La deuxième étape de la purification sera de précipiter l'activité toxique du filtrat de champignon avec le sulfate d'ammonium. D'abord, nous avons effectué des essais de précipitation des solutés du filtrat à l'aide de concentrations de plus en plus fortes de sulfate d'ammonium, ceci afin de déterminer la concentration précipitant la majorité de l'activité toxique du filtrat. Ceci est appelé fractionnement pilote, et sa procédure est la suivante:

- On prend 4 tubes pour centrifugeuse.
- On met 10 ml du filtrat de champignon dans chaque tube.
- On ajoute des pesées exactes de sulfate d'ammonium de façon à obtenir les pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium suivants: 60%, 70%, 80%, 90%. Les quantités à ajouter sont prises dans l'annexe E.

Le sulfate d'ammonium est rajouté par petites quantités et dissous en inversant doucement les tubes.

- Après dissolution complète du sel, on ajoute, en mélangeant, du NaOH à raison de 0.1 ml par g de sulfate d'ammonium d'ajouté.
- On met ensuite les tubes sur glace pour une heure, au bout de laquelle on les fait centrifuger pendant 20 min. à 2800 RPM et à 4°C.

Par la suite, on récupère le surnageant et le culot de chaque tube afin de les tester sur les larves de moustiques (L_3). Mais auparavant, on les fait dialyser dans du tampon phosphate pendant 3 jours afin d'éliminer le sulfate d'ammonium qui est toxique pour les larves de moustiques.

Pour ce test de moustique, on prépare une dilution de 1/5 pour chaque tube. Des témoins avec l'eau (E.D.N.D.) et le tampon phosphate, sans dilution, sont aussi préparés. Notons que dans chaque pot de plastique de 100 ml, on met 30 larves.

Soulignons que le fractionnement pilote permet d'obtenir les pourcentages de saturation A et B (A: le pourcentage le plus élevé où il y a encore peu de perte d'activité dans le surnageant. B: le % le plus bas où

l'essentiel de l'activité se trouve déjà dans le culot).

Et donc, le test sur les larves de moustiques nous a permis de savoir que:

A = 60% de sulfate d'ammonium

B = 80% " " "

Donc, 80% de sulfate d'ammonium fait précipiter l'activité toxique du filtrat du champignon.

Suite à ces résultats, on procède comme suit:

- On prend 300 ml du filtrat de champignon;
- On les fait précipiter avec le sulfate d'ammonium à 60%;
- On récupère le surnageant (après centrifugation);
- On le fait précipiter avec le sulfate d'ammonium à 80%;
- On récupère le culot (après centrifugation) qu'on fait dissoudre dans du tampon phosphate.

On a obtenu par la suite un volume de 10.5 ml. Après trois jours de dialyse du culot dans du tampon phosphate (1 litre, chaque jour), on a obtenu

un volume final de 16 ml.

Ainsi, les méthodes de purification qui vont suivre vont être faites à partir de ce culot contenant en principe la fraction toxique du champignon.

II-3.3 Chromatographie

Pour la chromatographie, on a utilisé deux sortes de gel: le Sephacryl^R S-200 et le Sephadex^R G-50. Par la suite, on a fait appel au FPLC pour mieux séparer les molécules du filtrat. À chaque étape de la purification des toxines, un dosage des protéines est réalisé pour en déterminer la concentration. La méthode utilisée est celle commercialisée par BIO-RAD et s'inspire de la méthode de Lowry (voir notice technique de la compagnie BIO-RAD). Une courbe étalon est établie avec l'albumine sérique de boeuf. La concentration est déterminée par report de la densité optique lue avec un spectrophotomètre (Perkin-Elmer Lambda 4B) à une longueur d'onde de 595 nm.

II-3.3.1. Sephacryl^R S-200 superfine

Le Séphacryl^R S-200 Superfine contient des liaisons covalentes de dextran allyle avec du N, N' - méthylène bisacrylamide afin de former un gel bien rigide.

Ce gel est insoluble dans tous les solvants et a une limite d'exclusion d'approximativement 250.000 daltons pour les protéines globulaires et approximativement 80.000 daltons pour les dextrans.

-Le Sephacryl^R S-200 Superfine est fourni sous forme de suspension dans l'eau distillée contenant 0.02% d'azide de sodium comme agent bactériostatique (Pharmacia, 1976).

Soulignons qu'avec ce type de gel, la séparation se fait en fonction de la dimension moléculaire des solutés.

Préparation de la colonne:

La colonne utilisée a un diamètre de 2.5 cm et une longueur de 100 cm. Étant donné que le Séphacryl^R S-200 est déjà gonflé, alors on remplit les 2/3 de la colonne avec ce gel et on l'équilibre avec 3 fois son volume de tampon phosphate auquel on a ajouté du NaCl (annexe D).

La vitesse de l'élution est de 34 ml/heure. On dépose par la suite 2 ml du filtrat de champignon dans la colonne et l'élution se fait avec le même tampon par la technique d'élution inversée.

Notons qu'on refait la même opération plusieurs fois, et que l'élution de chaque échantillon dure toute la nuit.

Les fractions récoltées sont passées au spectrophotomètre UV à 280 nm (UV-1 control, Pharmacia), et les pics d'absorption à 280 nm dans l'UV sont enregistrés sur un lecteur (UV-1 Control, Pharmacia). Cela nous permettra de déterminer les différents métabolites obtenus. Les fractions sont ensuite récoltées par un collecteur de fractions (Frac-100, Pharmacia).

Ainsi, avec le Séphacryl[®] S-200, on a obtenu 2 pics séparés (voir figure 14) et donc on additionne les fractions du 1^{er} pic entre elles. On fait la même chose pour le 2^e pic.

Vu que les fractions récoltées sont diluées, on procède à leur concentration par le polyéthylène glycol (P.E.G.) avant de les tester sur les larves de moustiques (L_3).

La méthode de concentration par le P.E.G. est la suivante:

On met les fractions récoltées de chaque pic dans un sac à dialyse (qu'on a utilisé dans la section II-3.1) sur lequel on saupoudre

une quantité de P.E.G. en paillettes, et on laisse le tout à 4°C jusqu'à obtention du volume initiale. Par osmose, l'eau ainsi que les petites molécules diffusent du sac pour dissoudre le P.E.G. à l'extérieur.

Pour le test sur les larves de moustiques, des lots de 30 larves sont mis dans des pots de plastique de 100 ml avec une dilution au 1/5 de la fraction dans 100 ml d'eau distillée non déminéralisée (E.D.N.D.), ceci est fait aussi bien pour le premier pic que pour le deuxième pic obtenus avec la chromatographie sur Sephacryl^R S-200.

Notons que les lots de 30 larves sont testés une seule fois puisque nous voulons seulement retracer où se trouve l'activité toxique du filtrat. Des témoins avec le tampon phosphate, l'EDND et le PEG sont aussi faits. Dans ce dernier cas (PEG), on met de l'EDND dans un sac à dialyse (de la même catégorie que précédemment) et on le soumet à l'osmose dans les mêmes conditions que pour concentrer les fractions récoltées. Ceci afin de vérifier si des petites molécules possiblement des monomères d'éthylène glycol qui seraient contenues dans notre PEG n'auraient pas diffusé dans le contenu du sac. Ces dernières pourraient être toxiques pour les larves de moustiques. Heureusement, tel ne fut pas le cas, mais il était nécessaire de faire ce témoin.

Après le test sur les larves de moustiques (L_3), on s'est rendu compte que seul le 2e pic est toxique pour ces dernières.

II-3.3.2 Chromatographie d'exclusion: Gel de filtration sur Sephadex^R

Le gel de Sephadex^R est un dextran modifié, polysaccharide qui, une fois placé en milieu aqueux, gonfle et forme un réseau aux mailles serrées.

Quand on prépare une colonne de chromatographie avec ce type de gel, le liquide d'élution circule entre les billes de Sephadex^R. Les substances dissoutes de taille ou dimension moléculaire (rayon de Stokes) importante traversent la colonne rapidement et sont éluées dans un volume appelé volume mort. Les substances de taille ou dimension moléculaire plus faible pénètrent dans les pores des billes et sont d'autant plus retardées dans leur migration que leur taille est plus petite.

Ainsi, dans l'effluent, les grosses molécules sortiront les premières et les petites, les dernières.

On voit donc qu'il s'agit d'une séparation en fonction de la dimension des solutés (Pharmacia, 1966).

Dans le but d'identifier le type de Sephadex^R qui permettra une meilleure séparation, on a utilisé 3 types de Sephadex^R, soit les G-25, G-50, G-75.

Cette étape nous a été nécessaire puisque nous ne connaissions pas le (ou des) poids moléculaire(s) de la (ou les) toxines. Ainsi, et d'après les graphiques de chromatographie des différents types des gels utilisés (voir figures 15, 16, 17), on a constaté que la meilleure séparation se fait par le Sephadex^R G-50.

Chromatographie d'exclusion:

Gel de filtration sur Sephadex^R G-50

* Préparation du Sephadex^R: On ajoute 5 g du Sephadex^R G-50 à 1 litre d'eau distillée déminéralisée, puis on le laisse gonfler pendant 3 heures à la température de la pièce (Pharmacia, 1966).

Avant de le mettre dans la colonne, on le dégage, sous trompe à vide, pour ne pas avoir de bulles d'air dans la colonne au cours de l'élution.

* Préparation de la colonne: On remplit les 2/3 de la colonne, de diamètre égal à 2 cm par le Sephadex^R G-50 et on l'équilibre avec 3 fois son volume de tampon phosphate (annexe D). Notons que la vitesse d'élution est de 1 ml/mn. On dépose par la suite 2 ml du filtrat du 2^e pic du S-200, après l'avoir reconcentré par le P.E.G. au volume initialement appliqué sur le S-200, en haut de la colonne et l'élution se fait avec le même tampon.

Et comme précédemment, on refait la même opération avec un nouvel échantillon de filtrat plusieurs fois pour recueillir le plus grand volume des divers pics obtenus.

Les fractions récoltées suivent le même chemin que précédemment avec le Séphacryl^R S-200 (Spectrophotomètre UV à 280 nm, enregistreur, collecteur de fractions).

Avec le Sephadex^R G-50, on a aussi obtenu 2 pics bien séparés (voir figure 16). De la même façon, on additionne les fractions récoltées de chaque pic entre elles.

On procède par la suite à leur concentration par le PEG avant de les tester sur les larves de moustiques (L₃).

Pour le test sur les larves (L_3), des lots de 30 larves sont mis dans des pots de 100 ml avec l'E.D.N.D. et une dilution de 1/5 des pics, ceci est fait pour le premier et le deuxième pic, séparément. Le test est fait une seule fois. Des témoins avec le tampon phosphate, l'E.D.N.D. et le P.E.G. sont aussi faits.

Et comme avec le Sephacryl^R S-200, on teste sur les larves une partie du liquide et on garde l'autre partie pour les étapes suivantes.

II-3.3.3 Flow Pressure liquide chromatography (FPLC)

La FPLC permet des séparations extrêmement rapides (quelques minutes) dans des colonnes de dimensions variables. De plus, la qualité de la résolution, est nettement améliorée grâce à la faible taille des billes de Superhose^R (Wajcman et Elion, 1983). La colonne utilisée (Superhose^R 12 HR 10/30) contient un gel d'agarose de type Superhose (Pharmacia, 1990).

Parmi les caractéristiques de cette colonne citons:

- la limite d'exclusion des protéines globulaires = 2×10^6 MW.

- la moyenne de taille des particules: 10 - 11 μm

De plus, cette colonne mesure 32 cm de longueur et a un diamètre de 1 cm.

La colonne est d'abord équilibrée avec le tampon d'élution (tampon phosphate) (Annexe C) qui est injecté au moyen d'une pompe (Pump - P500, Pharmacia) à une pression de 3 MPascal. Notons que durant toute l'expérience, on travaille avec la même pression (3 MPa).

Soulignons que la séparation se fait en fonction de la dimension moléculaire des solutés du filtrat.

Afin d'avoir une meilleure séparation des pics obtenus à partir du gel Sephadex^R G-50, on les fait passer séparément dans la colonne du FPLC.

En effet, on dépose dans la colonne, par l'intermédiaire d'une seringue, 0.5 ml de chacun des 2 pics obtenus du Sephadex^R G-50 séparément, après les avoir reconcentrés par le P.E.G. au volume initialement appliqué sur le G-50.

L'élution se fait toujours avec le tampon phosphate, à des débits variables.

Ainsi, le passage dans la colonne du FPLC de chacun des deux pics obtenus avec le Sephadex^R G-50 a donné un faible pic pour chacun (voir figures 18 et 19).

Étant donné qu'on est allé un peu loin dans la purification, et comme on l'a mentionné précédemment, alors on utilise les néonates pour le test sur les larves de moustiques, puisque ces larves neonates sont plus sensibles et le test permet de détecter des concentrations plus faibles de toxines. Soulignons que les dilutions successives du filtrat au cours des diverses étapes de purification conduisent à la dilution et à la perte de produit à chaque étape.

8 larves (néonates) ont été testées et observées pour une période de deux journées.

II-3.4 Estimation du PM des molécules toxiques du filtrat du champignon

Afin d'estimer le poids moléculaire des molécules toxiques du filtrat de champignon, on refait l'opération du sac à dialyse, mais cette fois, on utilise deux membranes:

- l'une est conçue pour que seulement les molécules de P.M. < 25 kDa puissent la traverser (7 spectra/Por MWCO: 25 000).
- l'autre conçue pour que les molécules de P.M. < 50 kDa puissent la traverser (7 spectra/Por MWCO: 50 000).

Les membranes utilisées sont de marque Spectrum.

Ainsi, on procède de la même façon qu'avec l'autre type de sac à dialyse (section II-3.1)., c'est-à-dire on remplit les sacs à dialyse chacun avec 40 ml du filtrat de champignon et on les met, toujours séparément dans 60 ml de tampon phosphate (annexe C). L'opération se déroule à 4°C et avec agitation.

Après une nuit de dialyse, on remplace les 60 ml du dialysat, qu'on récupère pour le test sur les larves de moustiques, par 500 ml de tampon phosphate. Et après une deuxième nuit de dialyse, on refait la même chose.

Pour le test sur les larves de moustiques (L_3), on prépare une dilution de 1/5 pour les adialysats et 2/25 pour les dialysats, une seule fois. Des témoins avec l'E.D.N.D. et le tampon phosphate sont aussi

préparés. Notons que des lots de 30 larves sont mis dans des pots de 100 ml.

II-3.5 Technique d'électrophorèse

On a utilisé cette méthode suite aux informations sur les poids moléculaire obtenus lors de la technique de dialyse (II-3.4).

En effet, cette technique permet d'estimer le P.M. des protéines à poids moléculaire élevé, grâce à des indicateurs connus de P.M.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) est une variante fort utilisé de la technique de séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE), laquelle sépare les protéines en jouant sur le rapport de leur charge à leur masse pendant qu'on applique un champ électrique à un mélange de protéines. À la différence de la méthode PAGE, la méthode SDS-PAGE sépare seulement selon la masse, en conférant, au départ, aux protéines une charge négative proportionnelle à la masse de la chaîne polypeptidique; de plus, du β -mercaptoéthanol et du SDS sont ajoutés au gel de polyacrylamide, dont les chaînes pontées fournissent le réseau tridimensionnel que les molécules à

séparer devront traverser. On forme le gel de polyacrylamide avec de l'acrylamide et du N-méthylène-bis-acrylamide mis à polymeriser en présence de deux agents polymérisant; le TEMED et l'ammonium persulfate. Du SDS et du β -mercaptoéthanol sont présents dans le mélange de protéines à fractionner, lequel est alors chauffé. Le β -mercaptoéthanol rompt les ponts disulfure, à la fois intra- et intermoléculaires, en libérant les chaînes polypeptidiques constitutives complètement dépliées. Le SDS, détergent anionique, déroule les structures protéiques et se fixe aux résidus hydrophobes de leurs chaînes, leur conférant une charge approximativement égale par unité de masse. Le mélange des chaînes polypeptidiques est ensuite déposé à une extrémité du gel, puis un champ électrique est appliqué au gel. Les chaînes polypeptidiques migrent au travers du gel en fonction du rapport de leur charge à leur masse. Puisque ce rapport est identique pour toutes les espèces chargées de SDS, leur vitesse de migration est inversement proportionnelle au trajet qu'elles doivent parcourir: ainsi, les grands polypeptides migrent plus lentement, devant passer par des parcours sinueux entre les mailles du gel, les petits, plus vite. Une fois séparées, les bandes de chaque espèce protéique apparaissent après coloration, par exemple, au bleu de Comassie.

* Gel de polyacrylamide - SDS (Page) (Laemmli, 1970).

-Matériel: -système BIO-RAD Protean II Xi Slab Cell

-Refroidisseur (Haake C, Fisher Scientific)

-Générateur de courant (Gelman Sciences Inc)

-Préparation du gel de séparation (12%):

Préparer une solution de monomère d'acrylamide 12%, en combinant: une solution stock d'acrylamide/bis 30% (40 ml), H₂O distillé (d) (33.5 ml), Tampon TRIS-HCl 1.5M pH= 8.8 (25 ml) et 10% (w/v) SDS (1 ml). Dégazer cette solution (sous-vide) pendant environ 15 min. Ajoutez ensuite une solution de 10% ammonium persulfate (APS) fraîchement préparée (500 µl) et du TEMED (50 µl) à la solution dégazée de monomère 12%. En utilisant une pipette (25ml) de verre, transférer la solution au centre de la sandwich de verre, en coulant le gel d'une manière continue de façon à prévenir tout mélange avec l'air. Recouvrir la solution de monomère avec une mince couche H₂O(d), pour enlever tout contact avec l'air. Permettre au gel de polymériser pendant environ 45 min. à 1 heure. Rincez la solution de recouvrement avec H₂O(d) et assécher à l'aide d'un papier filtre avant de couler le gel de compression.

-Préparation du gel de compression (4%):

Pour la préparation, suivre la même procédure que pour le gel de séparation mais en modifiant les volumes et le tampon utilisé. Ici on utilisera 1.3ml d'acrylamide/bis 30%, 6.1 ml de H₂O(d), 2.5ml de tampon TRIS-HCl 0.5M

pH=6.8, 100 μ l de 10% (w/v) SDS, ensuite 50 μ l 10% APS et 10 μ l TEMED. Placer le peigne dans la sandwich de verre et le mettre dans un angle de 10° afin qu'il n'y ait pas d'air qui s'emprisonne sous les dents du peigne lors du coulement du gel de compression. Couler le gel de compression avec une pipette de verre (25ml). Laisser polymériser pendant 45 min. à 1 heure. Retirer le peigne tout droit et vers le haut, rincer les puits complètement avec H₂O(d). Les gel est maintenant prêt pour le chargement des puits avec les inconnues.

-Préparation des inconnues:

Prendre 1ml de solution, y ajouter 10% (v/v) acide trichloroacétique dans un Eppendorff, pour précipiter les protéines, placer le tout à 4°C pour environ 1 heure. Centrifuger pendant 4 min. à vitesse maximum (centrifugeuse eppendorff). Jeter le surnageant, rincer le culot à l'acétone, resuspendre, centrifuger à nouveau pendant 4 min. (vit. max.). Jeter le surnageant. Resuspendre le culot dans le "sample buffer" (contenant 2% SDS, 10% Glycerol, H₂O (d) 5% mercaptoéthanol 62.5mM TRIS-HCl pH = 6.8) de façon à obtenir une concentration totale de protéines de 10 μ g/ μ l. Faire bouillir le tout à 100°C pendant 5 min. pour dénaturer les protéines. Laisser refroidir et charger les puits.

-Préparation du standard (Low Molecular Weight) Pharmacia

Ajouter au contenu de la fiole, 2.5 μ l de 10% (w/v) SDS, 5 μ l de β -mercaptoéthanol et 92.5 μ l de tampon TRIS-HCl 0.5M pH - 6.8 ainsi que 3 μ l de bleu de bromophénol-sucrose, placé dans un Eppendorff. Faire bouillir à 100°C pendant 5 min. le tout, ensuite laisser refroidir.

-Chargement des puits:

À l'aide d'une pipette automatique, prélever le contenu des Eppendorffs contenant soit le standard ou les inconnus après refroidissement et déposer le volume dans chaque puits.

-Électrophorèse (SDS-PAGE):

Monter l'appareil selon le guide de BIO-RAD "Protean II xi Cell Assembly", ajouter au fond du bac du tampon d'électrophorèse (25 mM TRIS, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3) 5X. Partir l'appareil refroidisseur à 20°C. Mettre sous tension, le gel, à 7.3 volts/cm pendant 5.5 heures.

-Coloration du gel:

Placer le gel dans une solution de fixation contenant 20% d'acide

sulfosalicylique dans de l'eau distillée.

Ensuite, placer le gel dans une solution de colorant contenant 25% d'isopropanol, 10% d'acide acétique, 0,12% de bleu de Comassie et 45% d'H₂O (d), pendant 12 hres.

Placer enfin le gel dans une solution de décoloration contenant 10% d'isopropanol et 10% d'acide acétique.

On remplace cette solution jusqu'à ce que la décoloration soit suffisante.

II-3.6 Test de la chaleur

Afin de vérifier la thermostabilité des molécules toxiques du filtrat de champignon, on procède comme suit:

- On met 20 ml du filtrat dans un tube à essai qu'on porte à 60°C, pendant 30 min. au bain-marie.
- On refait la même opération, sauf que le tube à essai est porté à 100°C.

Pour le test sur les larves (L₃) de moustiques, pour chacun des deux cas, on fait une dilution de 1/5 une seule fois. Et toujours, des lots de 30

larves sont mis dans les pots de plastique de 100 ml.

II-4 Extraction des toxines du filtrat de champignon mis en culture sans agitation

Avec ce type de filtrat, on procède à l'extraction par les solvants organiques afin d'isoler les molécules toxiques.

Comme on l'a souligné précédemment, dans ce cas, on a des toxines de faibles poids moléculaires, contrairement aux molécules toxiques de l'autre filtrat qui ont des poids moléculaires élevés.

L'extraction par les solvants est une méthode de partage entre une phase aqueuse et une phase organique.

On fait appel à 2 extractions successives du même volume initial du filtrat. D'abord, on utilise le chloroforme pour extraire la tolypine, et par la suite, on ajoute le méthanol pour obtenir les cyclosporines (Vey, communication personnelle).

II-4.1 Extraction par le chloroforme

On fait appel à 2 extractions successives par le chloroforme. En effet, dans une burette, on mélange 250 ml du filtrat du champignon avec 250 ml de

chloroforme. On laisse décanter 2 heures puis on récupère la phase organique. On refait ensuite la même opération avec 250 ml de chloroforme. On fait ensuite le pool des phases organiques (505 ml) qu'on évapore grâce à un roto-évaporateur (Rotovapor R110). Elles sont ensuite lyophilisées grâce à un séchage à froid par un lyophilisateur pour obtenir, à la fin, un résidu solide sous forme de poudre.

La prochaine étape serait de tester ces phases organiques, à raison de 10mg/100 ml d'EDND sur les larves de moustiques (L_3). Des lots de 30 larves sont mis dans des pots de 100 ml.

II-4.2 Précipitation par le méthanol

On ajoute au filtrat restant (170 ml), après l'extraction au chloroforme, 170 ml de méthanol.

Après 2 heures de décantation, on obtient un précipité qu'on récupère afin de le centrifuger pendant 20 min.

L'étape suivante, c'est la lyophilisation du culot obtenu ainsi que du filtrat restant.

Pour le test sur les larves de moustiques (L_3), on procède de la même façon que précédemment (II-4.1), aussi bien pour le culot que pour le filtrat.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

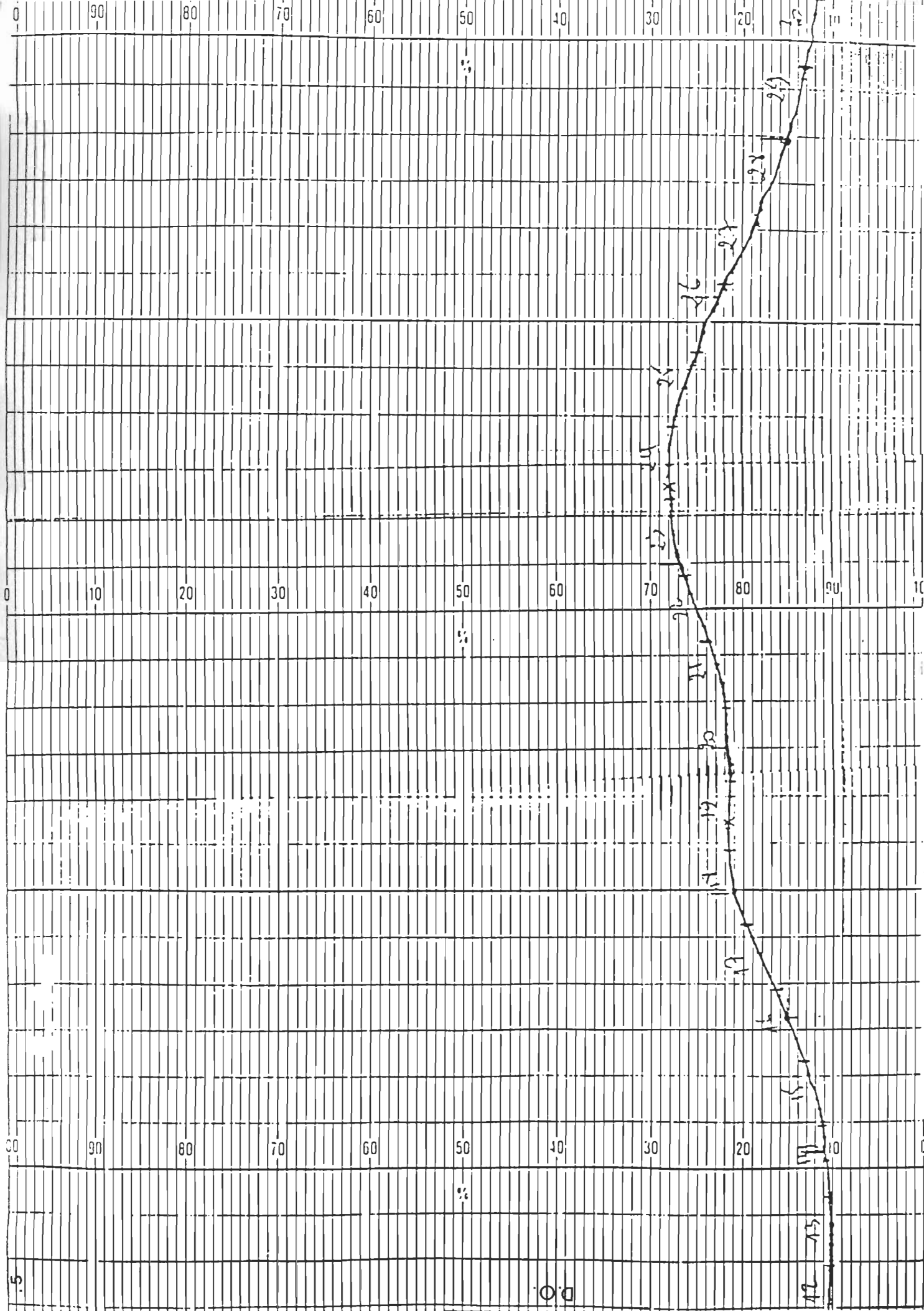
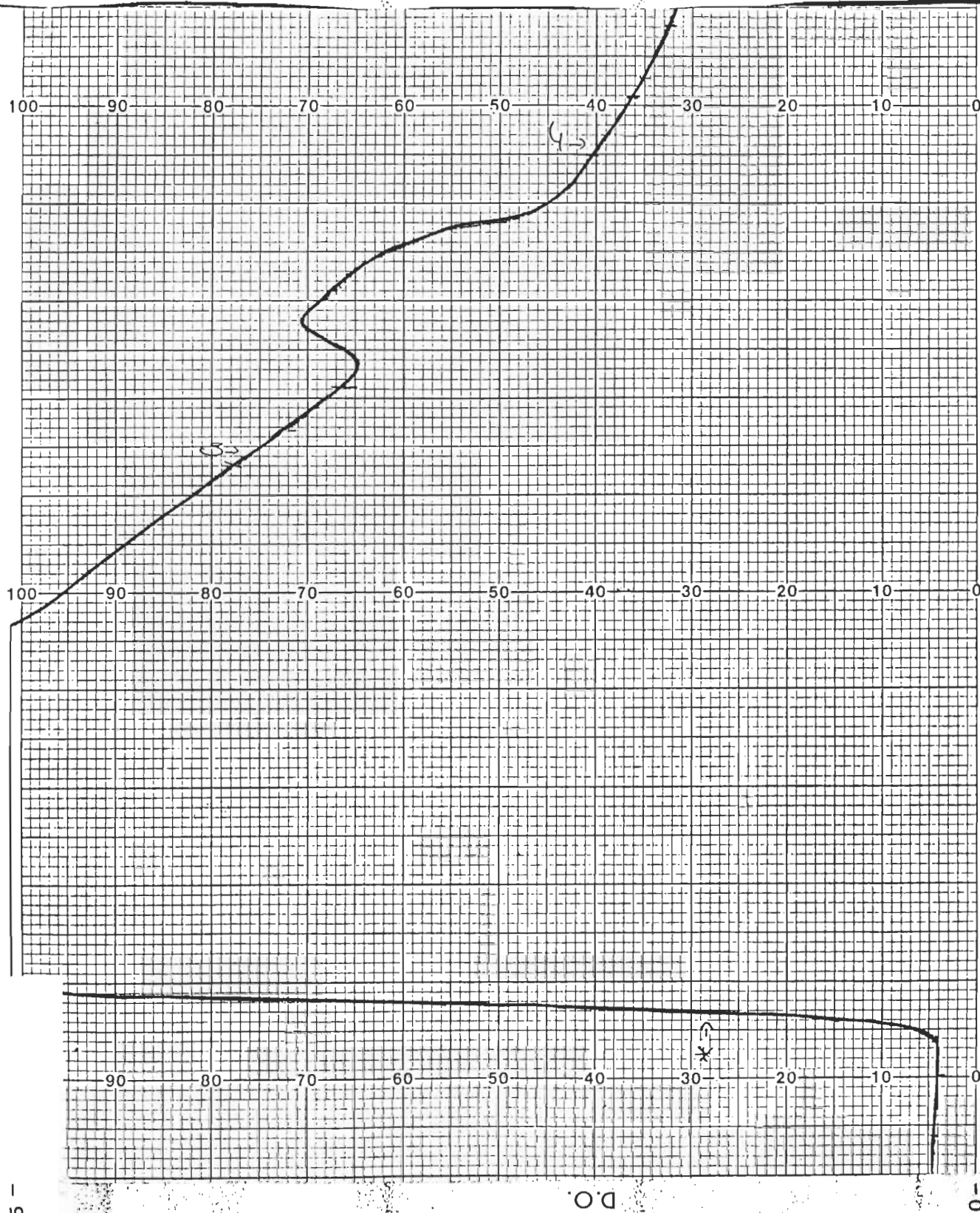


Figure 14. Chromatographie du filtrat sur le Sephacryl S-200



Printed in U.S.A.

Code No
13-0459-01

Salway, N.J. 08854
201-469-1222

Figure 15. Chromatographie du filtrat de *I. cylindrosporum* sur le Sephadex^R G-25 (2° pic au S-200)

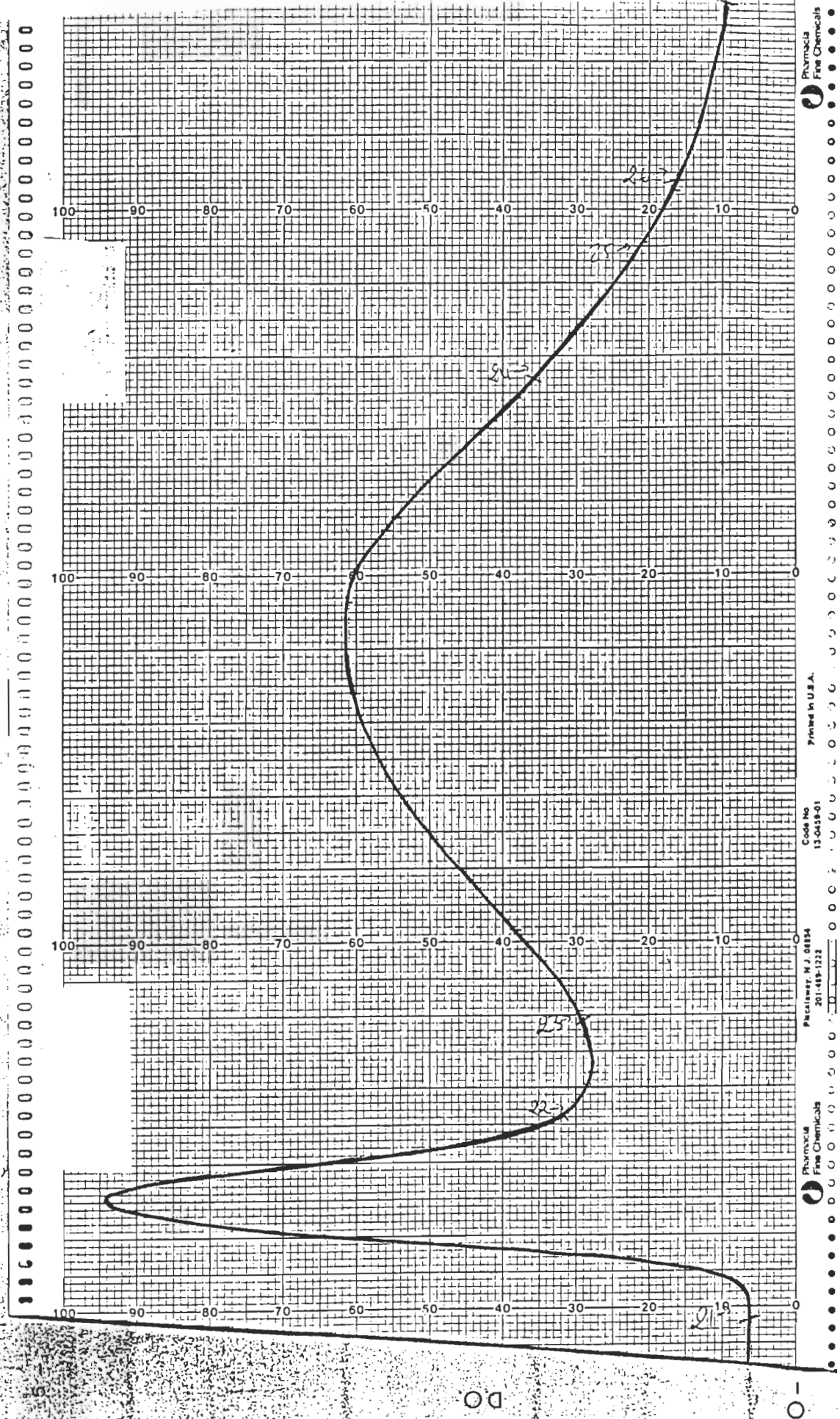


Figure 16. Chromatographie du filtrat de *I. cyclodrosporom* sur le Sephadex^R G-50

(2^e pic du S 200)

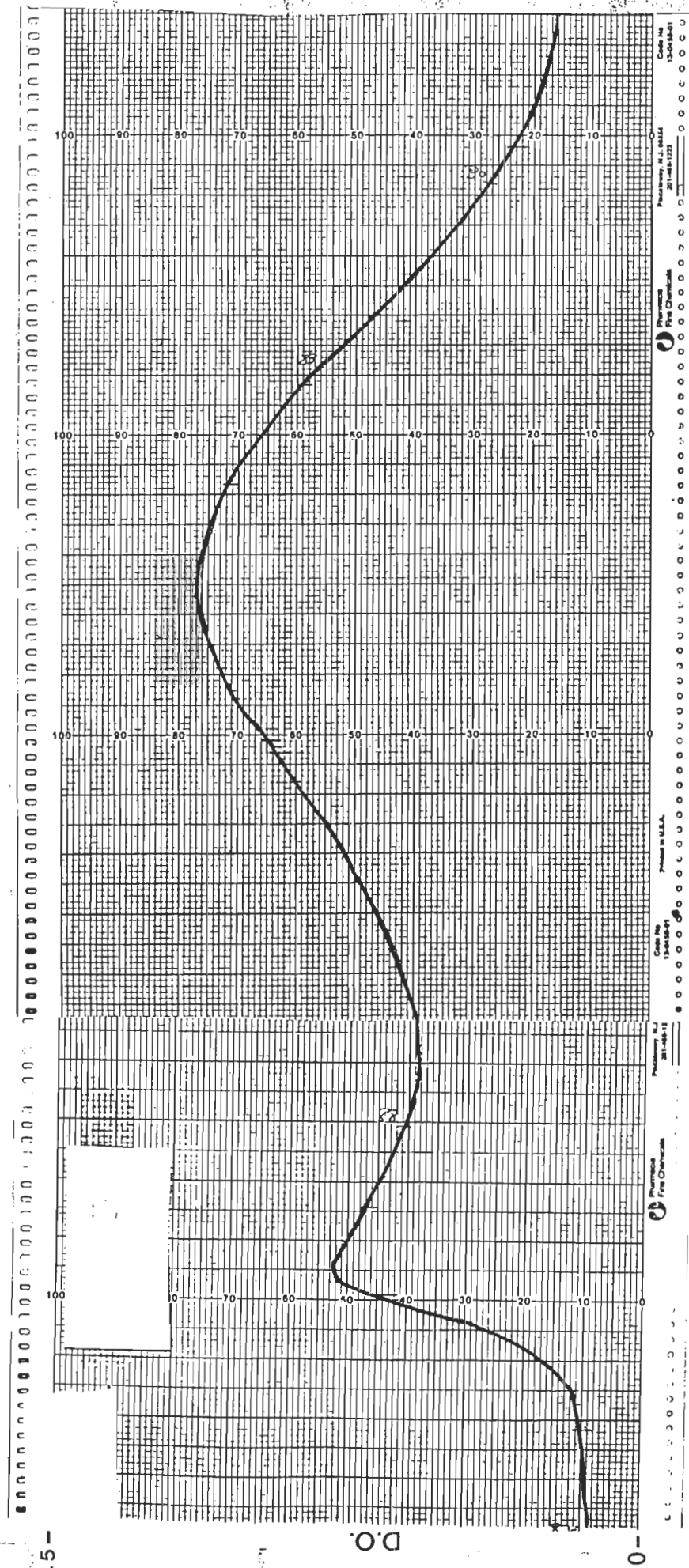


Figure 17. Chromatographie du filtrat de *I. cyclodrosporum* sur le Sephadex[®] G-75

1 ml = 1. ml

(2^e pic du 5.200)

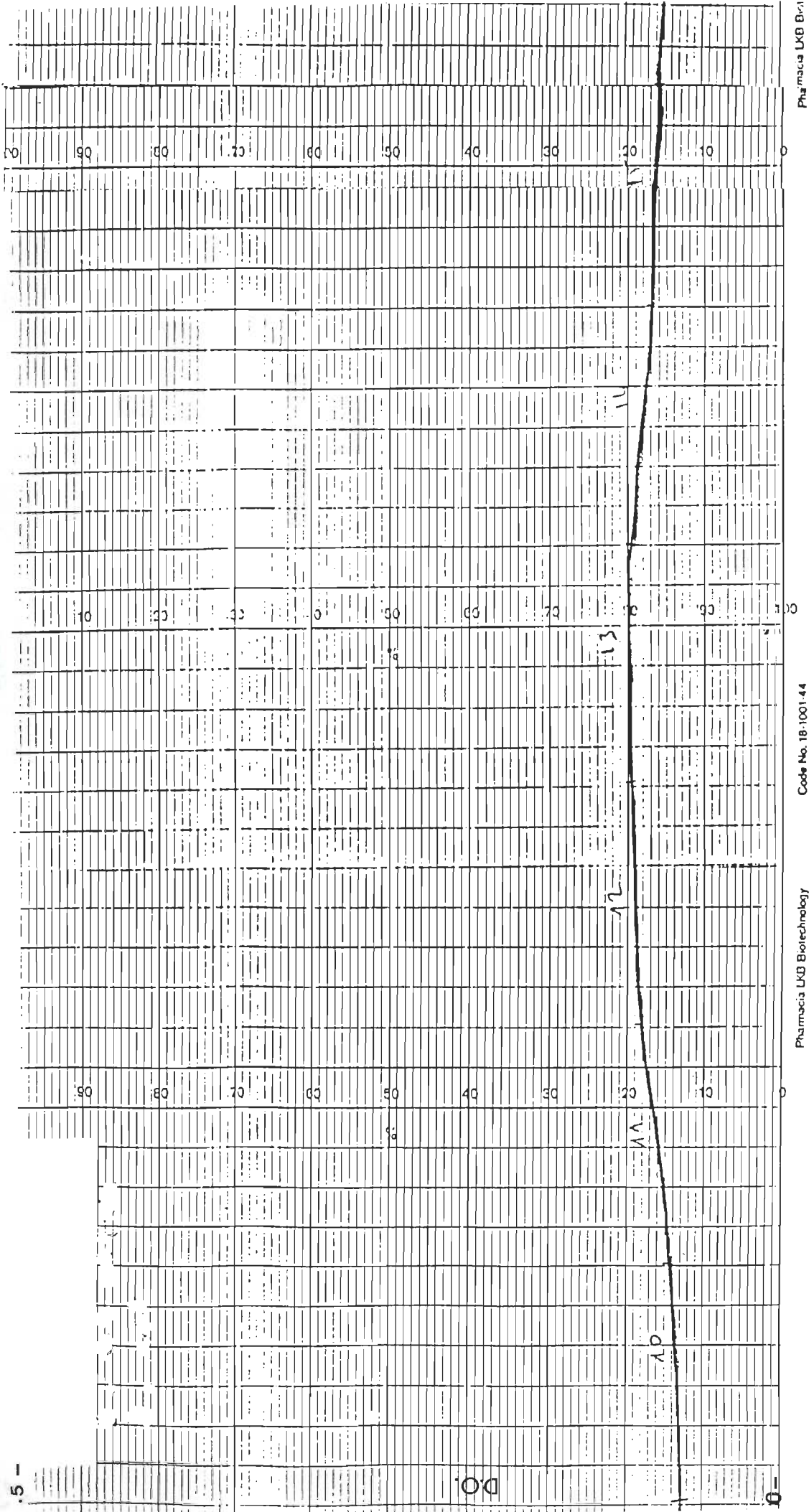


Figure 18. Chromatographie du filtrat (1er pic du G-50) sur la FPLC

1 = 1. ml

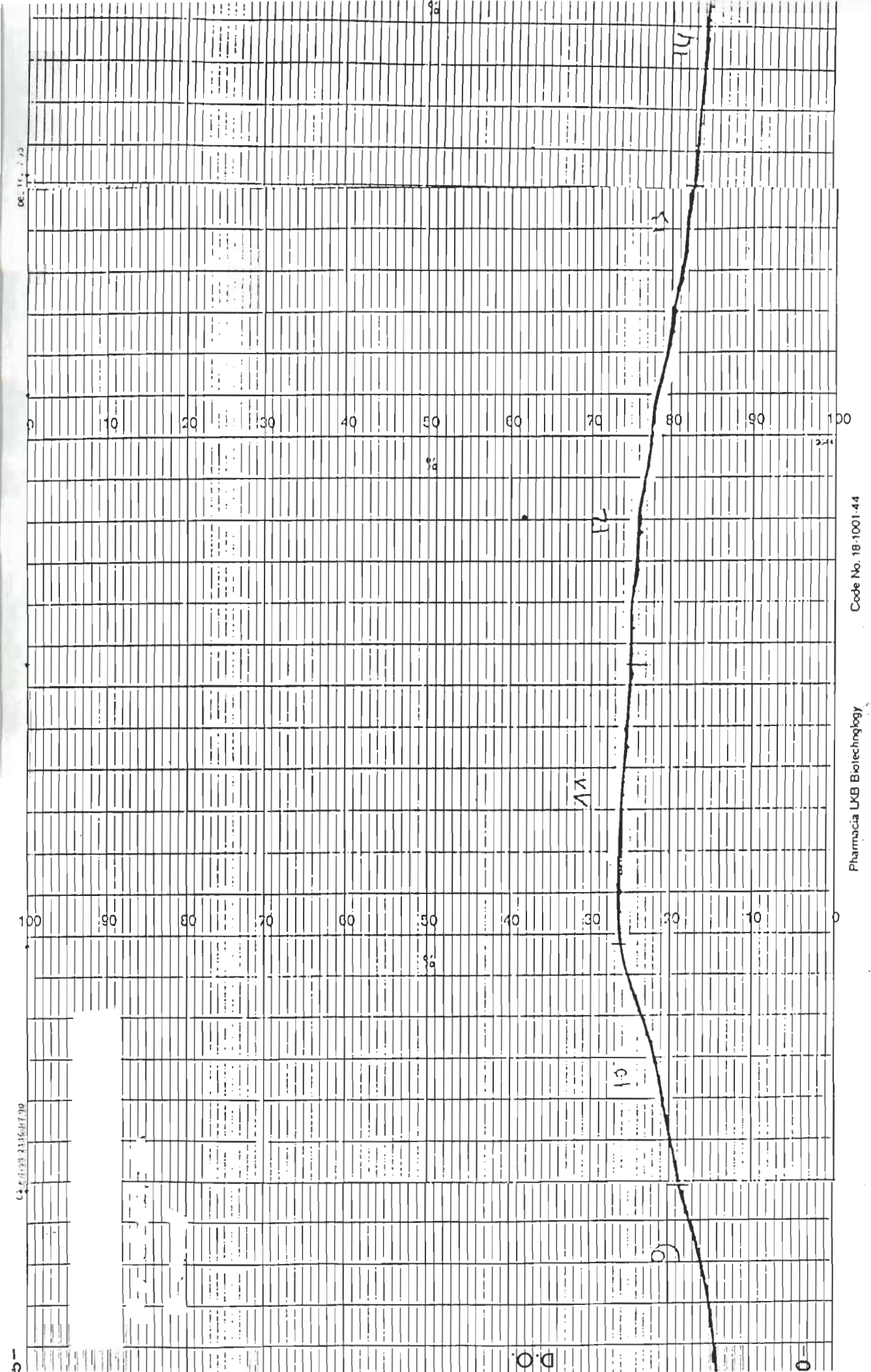


Figure 19. Chromatographie du filtrat (2e pic du G-50) sur la FPLC

TABLEAU 1

RÉSULTATS

Effet de filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide avec agitation sur les larves de moustiques (L₃)

Dilution	1/10	1/20	1/50	1/100	Témoins	
Temps de lecture des mortalités					EDND	Milieu Sabouraud
1er jour	1	0	0	0	0	0
2e jour	5	0	0	0	0	0
3e jour	48	4	0	1	0	0
4e jour	32	82	10	8	0	0
5e jour	-	3	11	3	0	0
6e jour	-	0	4	0	0	0
Nombre total de larves testés	86/90	87/90	25/90	12/90	0/90	0/90
% de mortalité	95.5	96.6	27.7	13.3	0	0

N.B.: * Les chiffres indiquent le nombre de larves de moustiques mortes, et ceci aussi bien pour ce tableau que pour les tableaux qui vont suivre.

* Temps 0: Le jour du bioessai.

D'après ce tableau, on remarque que même à une dilution de 1/100, on a 13.3% de larves mortes. Ainsi, plus le filtrat de culture possède une forte concentration de toxines, plus le pourcentage de mortalité est élevé. De plus, on voit clairement qu'il n'y a aucune mortalité dans les témoins (EDND et milieu Sabouraud).

TABLEAU 2

Effet du filtrat obtenu à partir de la mise en culture du champignon en milieu liquide sans agitation, sur les larves de moustiques (L_3)

Dilution	1/5	Témoins	
Temps de lecture des mortalités		EDND	Milieu Sabouraud
1er jour	36	0	0
2e jour	13	0	0
3e jour	8	0	0
Nombre de larves testés	57/60	0/60	0/60
% de mortalité	95	0	0

On remarque, d'après ce tableau, qu'à une forte concentration, on a un pourcentage de mortalité élevé. Dans les témoins (EDND et milieu Sabouraud), il n'y a aucune mortalité.

Remarque: Vu qu'on a obtenu un nombre élevé de mortalité des larves, on s'est limité à 3 jours pour le temps de lecture des mortalités.

TABLEAU 3

Résultats du test d'adialysat et du dialysat du filtrat (mis en culture avec agitation), sur les larves de moustiques (L_3). (Membrane: PM <14kDa)

	Adialysat				Dialysat		Témoins	
Dilution	1/5	1/10	1/20	2/25	1/25	1/50	Tampon phosphate	EDND
Temps de lecture des mortalités								
1er jour	2	3	0	0	0	0	0	0
2e jour	3	4	4	0	0	0	0	0
3e jour	12	10	8	0	0	0	0	0
4e jour	4	4	0	0	0	0	0	0
Nombre de larves testés	21/30	21/30	12/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
% de mortalité	70	70	40	0	0	0	0	0

On voit nettement, d'après ce tableau, que c'est au niveau de l'adialysat qu'on a eu un pourcentage élevé de mortalités des larves de moustiques. Par contre, au niveau du dialysat, aucune mortalité n'a été observée. Toujours pas de mortalité au niveau des témoins.

TABLEAU 4

Résultats du test pilote de précipitation du filtrat avec le sulfate d'ammonium sur les larves de moustiques (L₃) (culture avec agitation).

Sulfate d'ammonium	60%		70%		80%		90%		Témoin (EDND)
Temps de lecture des mortalités	S	C	S	C	S	C	S	C	
1er jour	2	0	2	1	0	1	0	4	0
2e jour	7	1	2	3	1	6	0	8	0
3e jour	0	3	0	3	1	2	0	4	0
4e jour	2	2	2	3	0	4	0	2	0
Nbre total des larves testés	11/30	6/30	6/30	10/30	3/30	13/30	0/30	18/30	0/30
% des mortalités	36	20	20	33.3	10	43.3	0	60	0

Ce qu'on peut tirer de ce tableau, c'est qu'au fur et à mesure qu'on augmente le pourcentage de sulfate d'ammonium, le pourcentage de mortalités diminue dans le surnageant et augmente dans le culot. De plus, aucune mortalité dans les témoins n'a été signalée.

TABLEAU 5

Résultats du test sur les larves de moustiques (L_3) avec les fractions récoltées à partir du Séphacryl[®] S-200

Fractions d'éluion	1er pic	2e pic	Témoins	
Temps de lecture des mortalités			phosphate	EDND
1er jour	0	1	0	0
2e jour	0	4	0	0
3e jour	0	6	0	0
4e jour	0	6	0	0
5e jour	0	5	0	0
Nbre total de larves testés	0/30	22/30	0/30	0/30
% des mortalités	0	73.3	0	0

Dilution: 1/5

D'après ce tableau, on voit bien que seules les fractions du 2e pic conduisent à la mort des larves de moustiques. Par contre, les fractions du 1er pic n'ont aucun effet sur ces dernières. Aucune mortalité au niveau des témoins n'a été observée.

TABLEAU 6

Résultats du test sur les larves de moustiques (L_3) avec les fractions récoltées à partir du Sephadex^R G-50.

Fractions d'élution	1er pic	2e pic	Témoins		
Temps de lecture des mortalités			Phosphate	PEG	E.D.N.D
1er jour	16	6	0	0	0
2e jour	10	16	0	0	0
3e jour	2	6	0	0	0
Nbre total de larves testés	28/30	28/30	0/30	0/30	0/30
% des mortalités	93.3	93.3	0	0	0

$$D = 1/5$$

D'après les résultats de ce tableau, on voit clairement qu'il y a mortalité des larves de moustiques aussi bien dans les fractions du 1er pic que dans celles du 2e pic obtenues à partir du Sephadex^R G-50. Notons qu'ils n'y a aucune mortalité au niveau des témoins.

TABLEAU 7

Résultats du test sur les larves de moustiques (néonates)
avec les fractions récoltés à partir du FPLC.

Temps de lecture des mortalités	1er pic*	2e pic *	Témoin
1er jour	1	2	1
2e jour	1	2	2
Total des mortalités	2/8	4/8	3/32
% des mortalités	25	50	9%

* Les pics obtenus à partir du Sephadex^R G-50 et passés dans la FPLC.

Ce tableau confirme que les deux pics récupérés avec le Sephadex^R G-50 sont toxiques pour les larves de moustiques.

Notons qu'on a un faible pourcentage de mortalité dans les témoins.

TABLEAU 8

Résultats du test d'adialysat et de dialysat sur les larves de moustiques (L_3).

(Membrane : PM \leq 25 kDa)

	Adialysat	Dialysat	Témoin
Dilution	1/5	2/25	
Temps de lecture des mortalités			
1er jour	10	0	0
2e jour	5	0	0
3e jour	6	0	0
4e jour	2	0	0
5e jour	2	0	0
Nbre total de larves testés	25/30	0/30	0/30
% de mortalité	83.3	0	0

TABLEAU 9

Résultats du test d'adialysat et de
dialysat sur les larves de moustiques (L₃)

(Membrane: PM <50 kDa)

	Adialysat	Dialysat	Témoin
Dilution	1/5	2/25	
Temps de lecture des mortalités			
1er jour	14	0	0
2e jour	4	0	0
3e jour	5	0	0
4e jour	3	0	0
5e jour	1	0	0
Nbre total de larves testés	27/30	0/30	0/30
% des mortalités	90	0	0

Ces deux tableaux nous montrent que c'est au niveau de l'adialysat qu'on localise la mortalité des larves de moustiques (L₃) et ceci, aussi bien pour le premier cas (PM <25 kDa) que pour le deuxième cas (PM <50 kDa). Aucune mortalité n'est signalée au niveau des témoins.

TABLEAU 10

Électrophorèse en SDS-PAGE des standards de poids moléculaires

Standards	Distance	R.F.	P.M.
α Lactalbumine (a)	9.8	0.70	14.400 Da
Inhibiteur de trypsine de fèves de soya (b)	7.6	0.55	20.100 Da
Anhydrase carbonique (c)	5.3	0.38	30.000 Da
Ovalbumine (d)	3.3	0.24	43.000 Da
BSA (e)	2.1	0.15	67.000 Da
Phosphorylase B (f)	1.2	0.09	94.000 Da

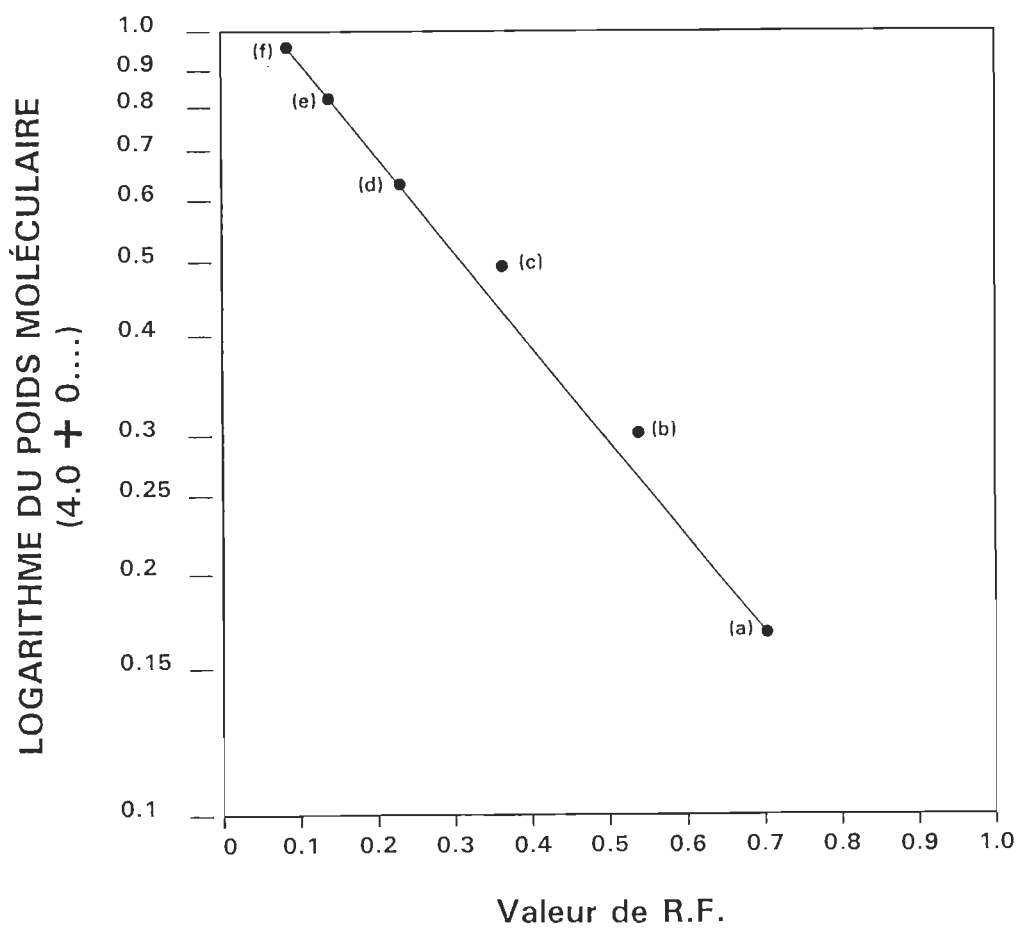


TABLEAU 11

Électrophorèse en SDS-PAGE
du filtrat de champignon

Bandes	D	R.F	PM (DA)
1	9.85	0.70	14 100
2	9.4	0.67	14 200
3	8.9	0.64	15 800
3a	8.65	0.62	16 200
4	7.95	0.57	17 800
5	7.3	0.52	19 900
6	6.5	0.46	25 100
6a	5.8	0.42	28 100
7	5.5	0.40	31 600
8	5.2	0.37	33 100
9	4.5	0.32	39 800
9a	3.7	0.26	43 600
10	2.7	0.20	63 000
11	2.1	0.15	66 000
12	1.85	0.13	70 800
12a	1.7	0.12	74 100
12b	1.5	0.10	76 000
13	1.1	0.07	93 300
13a	0.85	0.06	97 700

Avec l'électrophorèse en SDS-PAGE du filtrat de champignon, 19 bandes sont apparues sur le gel à une intensité variable selon la concentration en protéines.

Les bandes majeures (2,4,5,8), fortement colorées, apparaissent clairement sur le gel, tandis que les bandes mineures (1,3,6,7,9,10,11,12,13) sont plus faiblement colorés. D'autre bandes sont en état de trace (6a, 9a, 12a, 12b, 13c).

TABLEAU 12

Électrophorèse en SDS-PAGE
des fractions récoltées à partir des
gels de chromatographie: S-200, G-50, FPLC

S-200 (1er pic)	S-200 (2e pic)	G-50 (1er pic)	G-50 (2e pic)	FPLC (1er pic du G-50)	FPLC (2e pic du G-50)
13 (\pm)	13	13	13	13 (+/-)	13 (+/-)
12	12	12	12	12 (+/-)	12 (+/-)
11	11	11	11	.	
10 (+/-)	10 (++)	10 (+)	10 (++)	10 (+)	10 (++)
			9		
8	8	8	8		
7	7	7	7		
	6 (+/-)				
	5				
	4				
	3				
	2				

++ : forte intensité

+ : faible intensité

+/-: état de trace

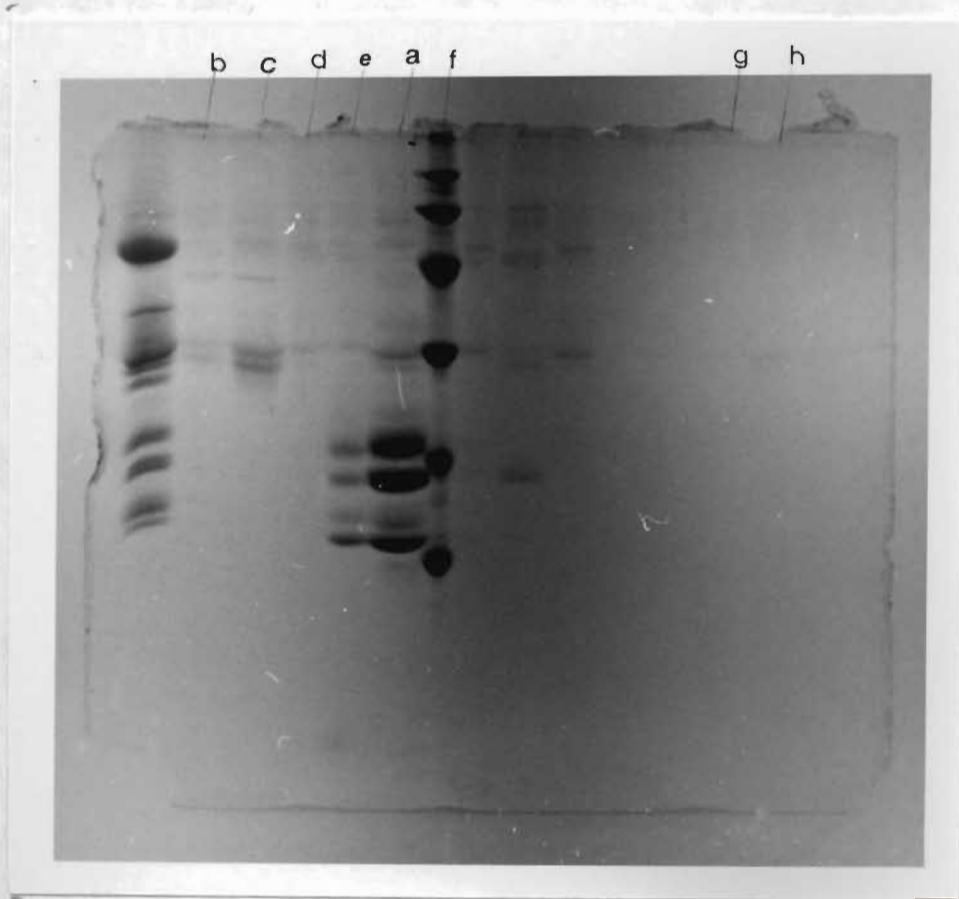


Figure 21: Électrophorèse en SDS-PAGE

- a: Filtrat de culture
- b: Sephadex[®] G-50 (1er pic)
- c: Sephadex[®] G-50 (2e pic)
- d: Sephacryl[®] S-200 (1er pic)
- e: Sephacryl[®] S-200 (2e pic)
- f: Standards
- g: F.P.L.C. (1er pic du G-50)
- h: F.P.L.C. (2e pic du G-50)

TABLEAU 13

Test de la chaleur

	60°C (30 min.)	100°C (30 min.)	Témoin
Dilution	1/5	1/5	
Temps de lecture des mortalités			
1er jour	8	8	0
2e jour	10	8	0
3e jour	3	5	0
4e jour	3	4	0
Nbre total de larves testés	24/30	25/30	0/30
% des mortalités	80	83.3	0

Le test de la chaleur nous montre qu'à 60°C ainsi qu'à 100°C, et pendant 30 minutes, le taux de mortalité des larves est élevé. Au niveau des témoins, aucune larve morte n'a été observée.

TALBEAU 14

Effets de la tolypène sur les larves
de moustiques (L₃)

Temps de lecture des mortalités	Phase organique de l'extraction avec le chloroforme (100mg/100ml)	Témoin
1er jour	6	0
2e jour	10	0
3e jour	5	0
4e jour	4	0
5e jour	4	0
6e jour	1	0
Total des mortalités	30/30	0/30
% de mortalités	100	0

TABLEAU 15

Effet des cyclosporines sur les larves
de moustiques (L₃)

Temps de lecture des mortalités	Extraction avec le méthanol (10mg/100ml)		Témoin
	Culot	Filtrat restant	
1er jour	0	0	0
2e jour	9	0	0
3e jour	4	0	0
4e jour	0	0	0
5e jour	3	0	0
6e jour	7	0	0
Total des mortalités	22/30	0/30	0/30
% des mortalités	73.3	0	0

D'après les tableaux 14 et 15, on remarque qu'il y a un pourcentage élevé de mortalité des larves aussi bien pour le premier cas (tolypine) que pour le deuxième cas (cyclosporines).

DISCUSSION

Avant de commencer d'interpréter les résultats obtenus, on aimerait d'abord mentionner la différence d'aspect du champignon (*T. cylindrosporum*) mis en culture avec et sans agitation.

En effet, quand on a mis en culture le champignon en milieu liquide agité, au bout de quelques jours, on a remarqué la croissance du mycélium sous forme de grosses boules. Au bout de 28 jours (maximum de production), les Erlenmeyers étaient remplis de mycélium, de couleur marron clair et toujours sous forme de grosses boules.

Par contre, la même souche de champignon mise en culture en milieu liquide stable donne un aspect différent que précédemment. En effet, au bout de quelques jours, il s'est formé une croute en surface du liquide (interface air-eau), de couleur blanche et d'aspect cotonneux. Avec le temps, le champignon a eu tendance à croître de plus en plus en profondeur jusqu'à obtention, au bout de 28 jours, d'une pâte qui recouvrait la moitié du volume de chaque Erlenmeyer.

EFFET DE FILTRAT DE CHAMPIGNON SUR LES LARVES DE MOUSTIQUES

D'après les tableaux 1 et 2, on remarque qu'au niveau des témoins (E.D.N.D., milieu Sabouraud), aucune mortalité des larves de moustiques (L_3) n'a été signalée. Le filtrat de champignon, par contre, semble être lui toxique ou même très toxique pour les larves de moustiques (L_3), si on tient compte du pourcentage de mortalité obtenu. Ceci est constaté dans les deux cas, c'est-à-dire quand le champignon est mis en culture en milieu liquide agité et stable.

Donc, il y a effectivement présence de molécules toxiques dans les 2 filtrats du champignon, et les prochaines étapes des expériences faites aideront à donner plus de renseignements sur ces molécules toxiques (P.M, nature, etc.).

Culture du champignon en milieu liquide agité

Résultats du test d'adialysat et du dialysat du filtrat de champignon sur les larves de moustiques

La dialyse du filtrat par une membrane qui ne laisse passer que les molécules dont le poids moléculaire est plus petit que 14 kDa, nous a permis de séparer ce dernier en deux parties: l'adialysat et le dialysat. Le test sur les larves de moustiques

(L₃) de ces derniers a montré que toute l'activité toxique est restée dans le sac à dialyse (Tableau 3), ce qui voudrait dire que le poids moléculaire de ou des toxines du filtrat de champignon ont un P.M. > 14 kDa. D'autre part, la dilution des molécules toxiques de faibles poids moléculaires qu'il y aurait dans le dialysat n'a été dans la première étape de la dialyse que de 2.5 (40 ml de filtrat de culture dans le sac à dialyse et 60 ml de tampon à l'extérieur). Il faut rappeler que le filtrat brut est encore toxique à une dilution de 1/100. À cette étape, on ne peut cependant pas écarter la possibilité d'une rétention dans le sac à dialyse d'aggrégats de molécules toxiques de faibles poids moléculaires, ou de charges sur celles-ci, ou la présence de molécules de nature hydrophobes toxiques. Cependant, par la technique de BIO-RAD, on retrouve dans le filtrat brut 10 à 12 $\mu\text{g/ml}$ de protéines.

Cette dialyse nous a aussi permis de nous débarrasser de certaines petites molécules du filtrat, qui sont non toxiques.

Précipitation par le sulfate d'ammonium du filtrat de champignon

Le but de cette précipitation du filtrat de champignon par le sulfate d'ammonium était de se débarrasser davantage des molécules non toxiques contenues dans le filtrat.

De plus, cette expérience permet la concentration des molécules toxiques du filtrat.

Notons que ces dernières ont précipité à 80% de sulfate d'ammonium (Tableau 4). Notons également qu'après précipitation au sulfate d'ammonium, on retrouve dans le précipité redissout 400 $\mu\text{g/ml}$ de protéines par la technique de BIO-RAD, soit une concentration d'environ 40 fois.

Chromatographie sur gel

Sephacryl^R S-200

Avec ce type de gel, qui est constitué de billes d'assez grande dimension, on a obtenu deux pics séparés (voir figure 14). Le test sur les larves de moustiques (L_3) nous a révélé que la toxicité se localise au niveau du deuxième pic (Tableau 5). Dans le deuxième pic du Sephacryl^R S-200, on retrouve par la technique de BIO-RAD 80 $\mu\text{g/ml}$ de protéines.

Ainsi, dans l'étape de purification suivante (Sephadex^R G-50), on a fait passer dans la colonne seulement ce deuxième pic reconcentré (jusqu'à la re-optention du volume initialement mis sur la colonne de S-200), puisque le premier semble contenir peu ou pas de molécules toxiques, afin de bien séparer les solutés les plus toxiques du filtrat de champignon.

Ainsi, on pourra isoler les substances les plus prometteuses comme insecticides microbiologiques.

Sephadex^R G-50

Avec le Sephadex^R G-50, on a aussi obtenu deux pics bien séparés (voir figure 16). Rappelons que les billes de ce gel ont une taille plus petite que celles du Sephacryl^R S-200.

Ainsi, le test sur les larves de moustiques (L₃) a montré qu'il y a activité toxique dans les deux pics obtenus (Tableau 6). D'où on peut tirer que le filtrat de champignon contient deux ou plusieurs toxines de poids moléculaire différent. De plus, on retrouve par la technique de BIO-RAD respectivement 18 µg/ml et 13 µg/ml dans le premier et le deuxième pic de la chromatographie sur Sephadex^R G-50.

FPLC

Les graphiques obtenus avec la FPLC montrent que si l'on fait passer dans la colonne de ce dernier chacun des deux pics obtenus précédemment avec le Séphadex^R G-50, après une étape de reconcentration (jusqu'à la re-optention d'un volume égal à celui mis sur la colonne de G-50), on obtient un faible pic pour chacun (voir figures 18 et 19).

De plus, le test sur les larves de moustiques (néonates) (Tableau 7) indique un pourcentage de mortalité de 25% avec le premier pic et 50% avec le deuxième. Le dosage des protéines par BIO-RAD donne respectivement pour chaque pic 15 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$.

Sac à dialyse (P.M. $< 25\text{kDa}$ et PM $< 50\text{kDa}$)

Afin d'avoir une idée sur le poids moléculaire approximatif des toxines de champignon, on a fait appel à ces sacs à dialyse. Avec ces types de membranes, toute l'activité toxique du filtrat est restée à l'intérieur du sac à dialyse d'après le test sur les larves de moustiques (Tableaux 8 et 9).

Donc, le poids moléculaire de nos toxines peut être supérieur à 50 kDa. Ce qui confirme le fait que la mise en culture de T. cylindrosporum en milieu liquide agité semble donner des molécules toxiques de poids moléculaire assez élevé. Mais cela n'écarte pas là, encore, la possibilité de rétention de petites molécules toxiques.

L'électrophorèse

En utilisant cette technique, on a obtenu environ 19 bandes de poids moléculaires variant entre 14 100 Da et 97 700 Da, et ceci en faisant passer le filtrat de champignon sur le gel de l'électrophorèse. De plus, le passage sur ce dernier de

chacun des pics récupérés avec le Sephacryl^R S-200 et le Sephadex^R G-50 a fait disparaître des bandes. Avec la FPLC, seules 3 bandes sont apparues sur le gel, l'une d'entre elles est colorée fortement (10), et les deux autres (12 et 13) sont plus ou moins nettes. Ceci nous indique que la composante 10 est la protéine majeure de la dernière fraction de chromatographie. On ne peut toutefois pas écarter à ce stade que la molécule toxique soit composée de plusieurs sous-unités protéiques. Notons que ces bandes (10, 12 et 13) correspondent à des poids moléculaires élevés, soit: 63 000 Da, 70 800 Da et 93 300 Da.

Test de la chaleur

L'activité toxique du filtrat de champignon persiste toujours même à une température de 100°C et pendant 30 min (Tableau 13).

Culture du champignon en milieu liquide stable

Avec le chloroforme, on a pu extraire du filtrat de champignon une catégorie des toxines de ce dernier, soit la tolypine. Le méthanol en a extrait une autre catégorie, soit les cyclosporines.

D'après les tableaux 14 et 15 et en se basant sur le pourcentage des mortalités des larves de moustiques (L_3), il y a une forte activité toxique aussi bien avec la tolypine qu'avec les cyclosporines.

Conclusion générale

Tout d'abord, on pourrait interpréter la différence d'aspect du champignon quand il est cultivé en milieu liquide agité et stable, par le fait que:

- Dans le premier cas (milieu liquide agité), le champignon se trouve dans des conditions d'aérobie, étant donné qu'il y a agitation continu des Erlenmeyers où se trouve le champignon, alors il y a renouvellement continu d'oxygène. Dans ces conditions, le champignon sécrète des molécules toxiques de haut poids moléculaires qu'il libère dans le milieu de culture et peu de toxines de faibles poids moléculaires puisqu'elles sont non dosables par les bioessais sur larves de moustiques. Rappelons que Tolypocladium cylindrosporum a un maximum de production au bout de 28 jours de sa mise en culture en milieu liquide.
- Quand au deuxième cas (milieu liquide stable), le champignon se trouve dans des conditions d'anaérobie et ceci, au fur et à mesure que le champignon croît en profondeur des Erlenmeyers. Soulignons que l'on a ajouté une quantité de glucose comme source d'énergie. Alors dans ces conditions, le champignon est capable de produire des molécules toxiques de faible poids moléculaire, qu'il libère aussi dans le milieu de culture. Il produit sans doute

mais dans une moindre proportion des toxines de hauts poids moléculaires (Vey, communication personnelle). Ainsi, dans les deux cas, le champignon produit des toxines et le but de mon projet était de les purifier.

Les méthodes de purification utilisées diffèrent selon chaque cas. Pour le filtrat de champignon récupéré avec la mise en culture en milieu liquide agité, on a fait appel à la chromatographie sur gel. Et pour l'autre filtrat (récupéré avec la mise en culture en milieu stable), on a pu extraire les toxines du champignon grâce à des solvants organiques.

De plus, on va essayer de faire l'analyse des résultats obtenus avec les méthodes de purification employées dans les deux cas.

* **Culture de champignon dans le milieu liquide agité**

Avant de procéder à la chromatographie sur gel, on a fait appel à deux étapes préliminaires. Ces dernières ont pour but d'abord d'avoir une idée sur le poids moléculaire approximatif des toxines du filtrat, ensuite d'éliminer les molécules non toxiques de ce dernier afin de concentrer de plus en plus l'activité toxique du champignon.

Ces deux étapes sont le sac à dialyse, dont la membrane est conçue pour que seules les molécules de poids moléculaires inférieur à 14 kDa puissent la traverser, et la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Avec le sac à dialyse, toute l'activité du filtrat est restée à l'intérieur du sac, d'après le test sur les larves de moustiques (L_3) de l'adialysat et du dialysat.

De cette première expérience, on peut déduire que le poids moléculaires de ou des toxines du filtrat est supérieur à 14 kDa et que cette ou ces dernières sont peut-être de nature protéique. De plus, l'adialysat contient une certaine part de protéines tel que l'a démontré le dosage des protéines du filtrat brut par la méthode de BIO-RAD.

Par la suite, on a pris l'adialysat et on l'a fait précipiter par des quantités variées de sulfate d'ammonium (60%, 70%, 80%, 90%).

Ainsi, d'après le test sur les larves de moustiques (L_3), 80% était le pourcentage de sulfate d'ammonium qui a fait précipiter la majorité de l'activité toxique du filtrat. Cette précipitation concentre les protéines environ 40 fois tel que démontré par le dosage des protéines par la méthode de BIO-RAD.

L'étape suivante fut la chromatographie sur gel qui avait pour but de séparer les solutés du filtrat ainsi que de savoir le nombre de toxines que contient ce dernier.

On a fait appel, au début, à un gel constitué de billes de grande dimension, soit le Sephacryl^R S-200.

Les graphiques de chromatographie obtenus avec ce type de gel montrent la présence de deux pics. Le test de chaque pic sur les larves de moustiques (L₃) nous a révélé que seul le deuxième pic semble être toxique, puisqu'on a obtenu 73.3% de mortalité des larves.

Par la suite, on a fait appel à un gel dont la dimension de ses billes est plus petite que celle du Sephacryl^R S-200, soit le Sephadex^R G-50, et ceci pour mieux séparer les solutés du filtrat. Ainsi, et d'après les graphiques de chromatographie obtenus, le deuxième pic obtenu avec le Sephacryl^R S-200 a été séparé en deux pics avec le Sephadex^R G-50.

Le test sur les larves de moustiques révèle que les deux pics du Sephadex G-50 sont toxiques pour ces dernières. De cela on peut tirer que le filtrat de champignon contient deux ou plusieurs toxines de poids moléculaires différents.

La FPLC fût la dernière étape de chromatographie utilisée. Cette méthode permet une séparation rapide (quelques minutes) des solutés du filtrat.

Le passage dans la colonne du FPLC de chacun des deux pics obtenus avec le Sephadex^R G-50 n'a pas permis une bonne séparation de ces derniers. En effet, chaque pic du Séphadex^R G-50 donne un faible pic avec la F.P.L.C. Le bioessai effectué avec les néonates montre une activité toxique de chacun des pics du F.P.L.C.

Nous avons pensé pouvoir utiliser les résines échangeuses d'ions DEAE-Sephadex^R A-50 et QAE-Sephadex^R A-50. Mais malheureusement ces deux types de gels ne nous ont pas permis d'obtenir des pics ayant une activité toxique. Aussi, avons nous opté pour trois techniques de chromatographie d'exclusion avec des gels ayant des propriétés différentes pour parvenir par étapes successives à purifier les toxines. À la fin de la rédaction de ce mémoire, nous avons appris que des collègues français collaborant sur ce même projet avec le laboratoire du Docteur Charpentier ont réussi en utilisant la chromatographie d'échange d'anions sur Fractogel^R EMD - DEAE-650 de Merck à purifier partiellement les toxines de I. cylindrosporium (Lacaille, 1992). Par contre lors de l'étape suivante sur échangeur de cations sur CM-Trisacryl^R aucune toxicité n'a été observée avec les pics obtenus.

Avant de passer à l'électrophorèse, on a voulu avoir une idée sur le poids moléculaire approximatif des toxines du filtrat de champignon. Pour cela, on a utilisé deux catégories de sac à dialyse. La première catégorie renferme les sacs à dialyse dont la membrane est conçue pour que seules les molécules de poids moléculaire inférieur à 25 kDa puissent la traverser. Et la membrane des sacs à dialyse de la deuxième catégorie laisse passer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 50 kDa.

Soulignons que dans cette expérience, on a travaillé avec le filtrat brut de champignon, c'est-à-dire qui n'a été ni précipité avec le sulfate d'ammonium ni passé dans les colonnes de chromatographie utilisées.

Le test sur les larves de moustiques (L_3) a montré que la toxicité se localise à l'intérieur du sac (adialysat) et ceci dans les deux catégories de sac à dialyse.

D'où on peut tirer que les toxines de notre champignon ont peut-être un poids moléculaire supérieur à 50 kDa. De plus, leur nature est probablement protéique. La nature protéique de notre molécule aurait pu être confirmée hors de tout doute par un traitement avec une protéase qui éliminerait l'activité toxique due à une protéine. Malheureusement, un test préliminaire réalisé en utilisant la trypsine comme protéase ne nous a pas permis de conclure, car la trypsine elle-même est toxique pour les

larves de moustiques. L'utilisation d'un inhibiteur de protéases n'aurait pas nécessairement obvié à ce problème, car notre toxine pourrait elle-même avoir une activité protéolytique comme chez d'autres champignons (Lysenko et Kucera, 1971). Dans le cas de Beauveria bassiana, l'activité protéique est reliée à un complexe de 2 composantes (Lysenko et Kucera, 1971).

Néanmoins, on a toujours retrouvé, lors des diverses étapes de purification ou de dialyse, l'activité toxique associée à une fraction contenant des protéines dosées par la méthode de BIO-RAD. La technique d'électrophorèse nous permet de préciser les poids moléculaires des molécules de hauts poids moléculaires présentes dans nos diverses fractions. En effet, les molécules restantes du filtrat de champignon après les différentes étapes de purification utilisées donc après la F.P.L.C., une fois passées sur le gel de l'électrophorèse, ont montré l'apparition, à la fin de ces étapes, de trois bandes correspondant à des poids moléculaires assez élevés.

Ainsi, on peut dire que notre souche de champignon sécrète, dans le milieu de culture, des molécules toxiques à haut poids moléculaire et ceci quand elle est cultivée en milieu liquide agité.

De plus, et comme on a pu purifier à partir de Matarhizium anisopliae une enzyme lipolytique, de Cordyceps militaris, une enzyme protéolytique et une quantité considérable d'amylases à partir d'Aspergillus flavus (Burgess et Hussey, 1971), on

peut soupçonner que les toxines partiellement purifiées de Tolypocladium cylindrosporum soient, en fait, des enzymes, vu leur poids moléculaire. Il faudra dans la suite de ce projet, après une purification plus poussée, vérifier les activités enzymatique associées à chacune de ces toxines de poids moléculaires élevés. En effet, grâce à la technique d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes, on pourrait séparer les trois bandes obtenues lors du passage des fractions du F.P.L.C. sur le gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

On pourrait aussi tester leur activité enzymatique envers l'amidon, les protéines et les lipides.

Aussi, grâce à des expériences, on pourrait mieux évaluer leur potentiel comme insecticides contre les diptères piqueurs en terme de LD_{50} et LD_{90} en mg de protéine, leur stabilité dans l'environnement et leur spécificité vis-à-vis des diptères, c'est-à-dire leurs effets sur d'autres formes de vie: mammifères, amphibiens, poissons et autres insectes ou invertébrés aquatiques non-cibles.

La dernière expérience faite avec le filtrat obtenu à partir de la culture de champignon en milieu liquide agité, fût le test de la résistance à la chaleur.

Ainsi, à 60°C et pendant 30 min. on a obtenu 80% de mortalité des larves de moustiques (L_3). Et à 100°C, aussi pendant 30 min., on a obtenu un pourcentage de

mortalité des larves de 83.3%.

Cette expérience montre que les toxines du champignon sont assez résistantes à une haute température.

Ceci semble être en similitude avec d'autres expériences faites avec d'autres toxines. En effet, les toxines du B.t.i. (Bacillus thuringiensis serovariété kurstaki) résistent à une température de 50°C et ceci pendant 28 jours, puisque le test sur les larves de moustiques montre qu'il y a eu 96% de mortalité au bout de ce temps (Ignoffo et al., 1982).

De plus, une heure à 65°C n'inactive pas les cristaux de B. t. var. sotto (Burgess et Hussey, 1971).

* **Mise en culture du champignon dans le milieu liquide stable**

L'extraction des toxines produites par Tolypocladium cylindrosporum dans ces conditions, se fait grâce à des solvants organiques (Vey, communication personnelle).

D'abord, on a fait appel au chloroforme afin d'extraire la tolypine. Et avec le volume restant du filtrat de champignon, on a pu extraire les cyclosporines en ajoutant

du méthanol.

Soulignons que le test sur les larves de moustique montre une grande activité toxique de ces toxines.

En effet, le test de la tolypine donne un pourcentage de mortalité des larves de 100%. Et le test des cyclosporines donne un pourcentage de mortalité de 73,3%.

Notons aussi que d'après la littérature, ces toxines ont un faible poids moléculaire, et sont peu prometteuses dans la lutte biologique puisqu'elles sont des immunosuppressives (Matha et Weiser 1988) et donc peuvent présenter un danger pour la faune non-cible.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BACK, C. BOIVERT, J., LACOURSIÈRE, J.O. et CHARPENTIER, G. 1985. High-dosage treatment of a Quebec stream with Bacillus thuringiensis serovar: israelensis: Efficacy against Black Fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects, Can. Entomol., 117: 1523-1134.
- BACK, C., LEBLANC, A., et AUBIN, A. 1983. Effet sur la dérive des insectes aquatiques d'un traitement au téméphos contre les larves de moustiques dans le Québec subarctique. Can. Entomol., 115: 703-712.
- BELLONCIK, S. POULIN, L. MAIRE, A. AUBIN, A., FAUVEL, M. et JOUSSET, F.W. 1982. Activity of California encephalitis group viruses in Entrelacs (province of Quebec, Canada). Can. J. Microbiol., 28: 572-579.
- BERLAND, L. 1948. Les insectes et l'Homme. P.U.F., Paris, 100 p.
- BISSETT, J. 1983. Notes on Tolypocladium and related genera. Can. J. Bot., 61: 1311-1329.
- BURGES, H.D. et HUSSEY, N.W. 1971. Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, New York, 861 p.
- CASSELLA, J.P. et HAY, J. 1991. Dermal lesions and Simulium posticatum: a report from Central England. The Entomologist, 1: 29-32.
- CODERRE, D. et VINCENT, C. (éditeurs), 1992. La lutte biologique. Gaëtan Morin éditeur, Boucherville (Canada). XXVIII- 671 p. Chapitre: CHARPENTIER, G. «Les entomopathogènes dans la lutte microbiologique contre les simules», chapitre 14, p. 285 à 303.

- DAIRES, D.M. 1981. Predators upon Black flies. "Blackflies, p. 139 à 158). The future for biological methods in integrated control", Éditeur Marshall Laird Academic Press, New York, XIV - 399 p.
- DE BARJAC, H. 1987. Operational bacterial insecticides and their potential for future improvement. K. Maramorosch (Ed.), Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture. Academic Press, New-York, 63-73 p.
- DREYFUSS, M. HARRI, E., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE, W. et TSCHERTER, H. 1976. Cyclosporine A and C New Metabolites from Trichoderma polysporum (Link ex Pers) Rifai, European J. Appl. Microbiol., 3: 125-133.
- FLINT, M.L. et VAN DER BOSCH, R. 1981. Introduction to integrated pest management. Plenum press, New-York, XV - 240 p.
- GAMS, W. 1971. Tolypocladium, line hyphomycetengattung with geschwollenen phralrden. Persoonia, 6: 185-191, cité dans Weiser, 1981.
- GOLDBERG, L.J. et MARGALIT, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculat, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosq. News, 37: 355-358.
- GUPTA, S., KRASNOFF, S.B., ROBERTS, D.W., RENWICK, J.A.A., BRINEN, L.S., et CLARDY, J. 1991. The structure of the efrapeptins - Potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus Tolypocladium niveum. J. Am. Chem. Soc., 113: 707-708.
- HALL, R.A. et PAPIEROK, B. 1982. Fungi as a biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology, 84: 205-240.
- IBARRA, J.E. et FEDERICI, B.A. 1987. An alternative brassey employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 187-192.

- IGNOFFO, C.M. 1988. CRC Handbook of Natural Pesticides volume V Microbial Insecticides Part A Entomogenous Protozoa and Fungi. CRC Press, Inc. Florida, 272p.
- IGNOFFO, C.M., GARCIA, C., KRONA, M. et COUCH, T.L. 1982. High Temperature Sensitivity of Formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Environmental Entomology, 2: 409-411.
- LACAILLE, J. 1992. Purification et caractérisation des effets insecticides de métabolites toxiques du champignon entomopathogène Tolypocladium cylindrosporum. Rapport de stage pour l'obtention du diplôme de baccalauréat en biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada, 36 p.
- LACEY, L.A. et UNDEEN, A.H. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ame. Rev. Entomol., 31: 265-296.
- LAIRD, M. AUBIN, A., BELTON, P., CHANCE, M.M., FREDEEN, F.J.H., HAWFE, W.O., HYNES, H.B.N., LEWIS, D.J., LINDSAY, I.S., MC LEAN, D.M., SURGEONER, G.A., WOOD, D.M. and SULTON, M.D. 1983. Insectes piqueurs du Canada: Effets sur la santé et conséquences économiques. Conseil National de Recherche du Canada, Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement. Publication C.N.R.C., no 1924 du secrétariat de l'environnement, Ottawa, Canada, 168 p.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- LEPAGE, S., CHARPENTIER, G., PACQUEUR, D., VEY, A. et QUIOT, J.M. (sous-
presse). Utilisation des toxines de champignons entomopathogènes dans la
lutte contre les Diptères piqueurs. Mémoire de la société royale belge
d'entomologie, 7 p.

- LYSENKO, O. et KUCERA, M. 1971. Micro-organisms as sources of new insecticidal chemicals: Toxins. Dans "Microbial Control of Insects and Mites", H.D. Burges et N.W. Hussey (éditeurs), Academic Press, New York, p. 205-227.
- MATHA, V., WEISER, J. et OLEJNIAK, J. 1988. The effect of tolypin in Tolypocladium niveum crude extract against mosquito and Blackfly larvae in the laboratory. *Folia parasitologica*, 35: 379-381.
- MOHAMED, A.K.A. et NELSON, F.R.S. 1985. Pathogenicity of Metarhizium anisopliae var. anisopliae to mosquito larvae. *Journal of parasitologica*, 35: 379-381.
- NOLLOY, D. et JAMNBACK, H. 1977. A larval black fly control field trial rising mermitrid parasite and its cost implications. *Mosq. News*, 37: 104-108.
- NADEAU, M. 1990. Isolation et évaluation de mycètes pour le contrôle biologique des moustiques (Diptera: culicudae) et des simulies (Diptera: Simuliidae) en zone tempérée. Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 130 p.
- NRCC (National Research Council of Canada), 1982. Biting flies in Canada: Health effects and economic consequences, NRCC publication, no 19248, 157 p.
- PAIS, M., DAS, B.C. et FERRON, P. 1981. Depsipeptides from Metarhizium anisopliae. *Phytochemistry*, 20: 715-723.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (Brochure), 1966. Sephadex. Gel filtration in theory and Practice, 56 p.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (Brochure) 1976. Sephacryl S-200 Superfine for high performance gel filtration, 15 p.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (Brochure) 1990. The Pharmacia FPLC System Fast Protein Liquid Chromatography, 9 p.

- RIBA, G., KEILA, A., SOARES, G.G. jr. et FERRON, P. 1986. Comparative studies of Metarhizium anisopliae and Tolypocladium cylindrosporum as pathogens of mosquito larvae, J. Am. Mosq. cont. Ass., 2: 469-473.
- RODHAIN, F. et PEREZ, C. 1988. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire, Maloine, Paris, 458 p.
- SAMSON, A.R. 1984. Entomopathogenic species of the hyphomycete genus Tolypocladium, J. Invertebr. Pathol. 43: 133-139.
- SAMSON, R.A., EVANS, H.C., et LATGÉ, J.P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, New York, XI-187 p.
- SAVIGNAC, R. et MARIE, A. 1981. A simple character for recognizing second and third instar larvae of five canadian mosquito genera (Diptera: culicidae). Can. Ent., 113: 13-20.
- SOARES, G.G. jr. 1982. Pathogenesis of infection by the hyphomycetous fungus, Tolypocladium cylindrosporum in Aedes sierrensis and Culex tarsalis. (Dip: arluidae). Entomophaga, 27: 283-300.
- SOARES, G.G. jr. et PINNOCK, D.E. 1984. Effet of temperature on germination growth, and infectivity of the mosquito pathogen Tolypocladium cylindrosporum (Duteromycotina: Hyphomycetes), J. Invertebr. Pathol., 43: 242-247.
- SOARES, G.G., jr., RIBA, G., CAWDAL, A. et VINCENT, J.J. 1985. Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen Tolypocladium cylindrosporum and two isolats of Tolypocladium extingiens. J. Invertebr. Pathol., 46: 115-120.
- VEY, A. 1989. Toxines de champignons pathogènes d'insectes et d'acariens. Conférence à l'U.Q.T.R.

- VEY, A. 1970. Cahiers de diététique, 5: 73-74.
- WAJCMAN, H. et ELION, J. 1984. Chromatographie liquide de haute performance en chimie des protéines, INSERM, Paris, 226 p.
- WEISER, J. et MATHA, V. 1988. Tolypin, a New insecticidal metabolite of fungi of the genus Tolypocladium, Journal of invertebrate pathology, 51: 94-96.
- WEISER, J. et MATHA, V. 1988. The insecticidal activity of cyclosporines on mosquito larvae, Journal of invertebrate pathology, 51: 92-93.
- WEISER, J. et PILLAI, J.S. 1981. Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycetes, Moniliaceae) a new pathogen of mosquito larvae. Entomophaga, 24: 357-361.
- WOOD, D.M. 1985. Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l'homme et au bétail. Agriculture Canada. Publication 1781 1f, 38 p.
- WRIGHT, V.F., VESONDER, R.F., CIEGHER, A. 1982 Mycotoxins and other fungal metabolites as insecticides. Microbial and Viral pesticides. Editeur Kurstak, E. Marcel Dekker Inc., New-York, p. 559-583.

ANNEXE A: Gélose "pabulum"

Peser 50 g de pabulum.

Mettre 9 g d'agar (BBL 11849) dans 500 ml d'eau distillée déminéralisée, le tout dans un ballon volumétrique de 1000 ml. Par la suite, remuer, mettre une bille magnétique au fond du ballon, chauffer sur une plaque jusqu'à dissolution complète puis passer à l'autoclave pour 20 min. Dès que retiré de l'autoclave, remplir les boîtes de pétri stériles.

ANNEXE B: Milieu Sabouraud dextrose Broth

Peser 90 g de Sabouraud dextrose (DIFCO 0382-01).

Mettre dans 3000 ml d'eau distillée déminéralisée dans un ballon volumétrique de 4000 ml. Par la suite, mettre une bille pour remuer le tout. Chauffer sur une plaque jusqu'à dissolution complète puis diviser le volume en 12 ballons (de 12 x 250 ml). Après on autoclave pour 20 min.

ANNEXE C: Tampon phosphate (0.02M)

2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1 l d'eau distillée déminéralisée (E.D.D.)

$\text{NaOH} \rightarrow \text{pH} = 7$

On met 2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans 500 ml d'eau distillée déminéralisée, puis on ajoute du NaOH (1N) jusqu'à l'obtention d'un pH neutre ($\text{pH} = 7$) en mesurant par l'intermédiaire d'un pH mètre et sous agitation magnétique. Puis on ajuste avec de l'eau distillée déminéralisée jusqu'au niveau de 1L.

ANNEXE D: Tampon phosphate (0.02M) (plus NaCl)

2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1L d'E.D.D.

$\text{NaOH} \rightarrow \text{pH} = 7$

5.84 g de Nacl.

Milligrammes de Sulfate d'ammonium à ajouter à 1ml de solution

pour atteindre le bon pourcentage de saturation à 0°C.

% Saturation
initiale

Concentration finale du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en solution

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	630	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	316	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	365	395	436	488	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	182	212	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

ANNEXE E